INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Supplemento das Memorias
No. 2 15 de Outubro, 1928

Febre Amarella

Summario:

Aragão, Dr. Henrique de Beaurepaire. Relatorio a respeito de algumas pesquizas sobre a febre amarella..... 23
Cunha, Drs. A. Marques da, e Muniz, Julio. Notas sobre a febre amarella..... 47
Torres, Dr. C. Magarinos. Alterações nucleares das cellulas do figado nas infecções de MACACUS RHESUS e M. CYNOMOLGUS pelo virus da febre amarella..... 55
Lacorte, Drs. José Guilherme, e Villela, Gilberto Guimarães. O liquido cephalo-racheano na febre amarella..... 62
Penido, Dr. J. C. N. Observações sobre alguns elementos da urina na febre amarella..... 65

NOTA:
O supplemento das Memorias destina-se á publicação immediata das pesquizas realizadas no Instituto Oswaldo Cruz.

RIO DE JANEIRO
Typ. do INSTITUTO OSWALDO CRUZ
1928

Relatorio a respeito de algumas pesquizas sobre a febre amarella.

Pelo Dr. HENRIQUE DE BEAUREPAIRE ARAGÃO.

(Chefe de Serviço)

Os casos de febre amarella recentemente occorridos no Rio de Janeiro nos offereceram opportunidade para uma serie de pesquizas experimentaes, sobre o assumpto, cujos resultados dão motivo ao presente trabalho. Antes de relatal-os aproveitamos o ensejo para externar aqui os nossos sinceros agradecimentos aos Drs. CLEMENTINO FRAGA, ROCHA LIMA, FREDERICO SOPER, NELSON DAVIS, JOHANNES BAUER, BARROS BARRETO, SINVAL LINS, BRUNO PESTANA, RAUL DI PRIMIO, AMADEU FIALHO, ARRUDA BOTELHO, CARLOS DRUMMOND, assim como aos Drs. CARLOS CHAGAS, ALCIDES GODOY e todos os collegas companheiros de Manguinhos pelo valioso auxilio que, por diversas maneiras, prestaram a essas investigações.

Os assumptos que mais de perto nos interessaram até aqui foram os seguintes:

I. Transmissão da febre amarella aos macacos.
II. Pesquizas do virus no sangue e orgãos de individuos fallecidos de febre amarella.
III. Pesquiza da *Leptospira icteroides* no doente, no cadaver e nos macacos infectados.
IV. Identidade entre febre amarella africana e a sul americana.
V. Diagnostico sôrologico da febre amarella.
VI. Vaccinação contra a febre amarella.

I

TRANSMISSÃO DA FEBRE AMARELLA AOS MACACOS.

A descoberta, por parte de STOKES, BAUER e HUDSON de que a febre amarella na Africa era transmissivel aos *Macacus rhesus*, veio abrir largo campo para as pesquizas experimentaes sobre o assumpto, no qual até então, só tinham tido successo seguro as experiencias feitas no homem. Os casos de febre amarella do Rio de Janeiro nos offereceram opportunidade para que egualmente tentassemos obter a transmissão da molestia americana a algumas especies de simios, usando nós, com esse objectivo, até agora de exemplares das seguintes especies: *Macacus rhesus, Macacus cynomolgus, Macacus speciosus* todos estes de origem asiatica e da especie brasileira, muito commum, *Pseudocebus azarae*.

As tres primeiras especies se mostraram sensiveis sendo possivel produzir nellas a infecção amarillica tanto por inoculações de sangue humano como pela picada e inoculações de mosquitos experimentalmente infectados em doentes, ou ainda pela inoculação nos animaes dessas especies, de sangue e orgãos de macacos infectados no laboratorio.

A maioria de nossas observações foi feita em *Macacus rhesus*, dos quaes temos tido em uso bastantes exemplares.

As inoculações de material humano em *Macacus rhesus* e *cynomolgus* foi feita com material retirado de 21 doentes, uns com formas graves, outros benignas, sendo 16 com 10 a 72 horas de molestia e 5 com prazo maior de 3 dias. Esses sangues foram inoculados em 26 *rhesus* e 1 *cynomolgus*.

Algumas vezes por dispormos, no começo, de poucos animaes fomos obrigados a inocular sangue de dous doentes em um unico animal; desde, porêm, que tivemos *rhesus* em maior numero se tornou possivel injectar cada sangue em um macaco e ás vezes o sangue do mesmo doente, em differentes dias de molestia, foi inoculado a varios macacos.

As quantidades de sangue injectadas oscillaram entre 5 e 10 cc.; raramente mais. Ora o sangue era citratado, ora não, e, neste caso, o que se injectava era sôro, ás vezes um tanto sanguinolento, pela presença nelle de muitos globulos vermelhos.

As infecções mortaes, obtidas nos macacos inoculados com sangue de doentes com menos de 72 horas, alcançaram o numero de 4, tendo sido negativas todas as feitas com sangue de individuos com mais de 72 horas de molestia.

Dos macacos que não morreram em consequencia de injecções de sangue de doentes com menos de 72 horas, um certo numero apresentou reacções febris, mais ou menos typicas, algumas das quaes foram evidentemente uma infecção benigna, porquanto esses macacos inoculados ulteriormente com o figado virulento nenhuma reacção apresentaram, demonstrando que estavam immunes. Outros macacos, porêm, nas mesmas condições que os anteriores, injectados com o mesmo virus, succumbiram á injecção, parecendo não terem tido uma infecção especifica, ou a immunidade por acaso por elles adquirida, em consequencia da injecção do sangue do doente, não foi sufficiente para protegel-os contra a infecção produzida pela inoculação de material virulento.

Observámos uma vez que o sangue de um doente (caso grave e mortal) injectado em dous dias successivos causou a morte do animal com a amostra colhida 36 horas depois do inicio da molestia, ao passo que, aquella que foi retirada estando o doente com 10 horas apenas, não produziu, no animal, senão pequenas oscillações febris pouco typicas. Este macaco, porêm, se mostrou immune á injecção ulterior de virus, o que demonstrou ter elle tido uma infecção ligeira mas insufficiente para produzir a sua morte. Os mosquitos que sugaram o mesmo doente tanto com 10 como com 36 horas de molestia se infectaram e se mostraram capazes de transmittir a molestia ao *Macacus rhesus*.

Dos 4 casos em que a inoculação de sangue produzio uma infecção mortal nos macacos, 3 provinham de doentes muito benignos de febre amarella e 1 de um caso grave mortal, o que parece demonstrar que os casos benignos são mais favoraveis á infecção dos macacos do que os graves. Na maioria dos casos as injecções de sangue foram feitas no mesmo dia da colheita, mas não ha nenhum incoveniente em que o sangue seja conservado na geladeira a 8 gráos, pois tivemos 2 inoculações positivas com sangue que estivera 48 horas naquella temperatura, e 1 com sangue guar

dado, nas mesmas condições, durante 9 dias. Estes mesmos sangues que foram positivos com 48 horas deram resultados negativos quando inoculados com 14 dias de conservação em temperatura de 0º, não nos parecendo que a conservação do virus a frio, seja segura alem de 10 dias, nem que temperaturas abaixo de zero sejam especialmente favoraveis para isso, pois não observámos melhor conservação do virus nesta temperatura.

Os resultados das inoculações de sangue dos doentes nos *Macacus rhesus* mostram que estes simios não são tão sensiveis quanto fôra de esperar-se e, que de um grande numero de animaes, sómente alguns delles vêm a morrer, e outros ou têm uma infecção ligeira ou nada apresentam e nem mesmo adquirem, alguns, uma immunidade solida capaz de os fazer resistir a uma inoculação ulterior do virus.

A actividade do virus isolado do animal não parece ser desde logo muito grande, depois de 4 passagens não obtivemos mais de 0,2 cc. de sangue como dose minima mortal, mas certamente, com inoculações successivas em *rhesus*, afinal se conseguirá obter virus capazes de matar na dose de 0,0001 milligramma, como succede aos isolados na Africa.

A molestia no *rhesus* infectado pela inoculação de sangue de doente, ou sangue e orgãos de outro *rhesus*, ou a obtida pela picada do *Aedes ægypti* ou pela inoculação de emulsões desses insectos, evolue num prazo que varia de 5 a 15 dias, sendo este o periodo maximo por nós observado. A doença transcorre, entre nós, de modo absolutamente semelhante ao observado nos animaes infectados com os virus isolados na Africa, pela commissão americana.

Nos casos de evolução rapida a temperatura se eleva, ás vezes, desde os primeiros dias; outras vezes ha, a principio, algumas alternativas de elevações e baixas de temperatura, mais ou menos accentuadas, e no 4º e 5º dias a curva thermica sobe bruscamente de 1 a 1,5 gráos acima da normal primitiva do animal e no dia seguinte começa a cahir, rapidamente, entrando elle em hypothermia accentuada e afinal morre em collapso. Os traçados juntos (figs. 6, 7 e 8) dão uma ideia clara das curvas thermicas em taes casos.

Geralmente, no periodo em que a temperatura se eleva bruscamente, o animal perde o appetite e começa a apresentar menor vivacidade. Quando ella principia a cahir rapidamente abaixo da normal o macaco fica triste, encolhido a um canto da gaiola, deixa-se facilmeute apanhar e muito enfraquecido apoia o corpo nos membros dianteiros um tanto affastados um do outro, e sua cabeça pende para diante, numa posição muito caracteristica. Finalmente o animal tomba a fio comprido na gaiola e não tarda a morrer. (Figs. 2 e 3).

Nem sempre, porêm, uma baixa accentuada da temperatura é signal seguro de morte do animal, o qual póde recuperar a temperatura e curar-se mesmo depois de uma quéda brusca de cerca de dous a tres gráos abaixo da normal.

Quando a molestia se prolonga muito, então a regra é haver duas ou mais elevações thermicas, seguidas de periodos de temperatura quasi normal, ou sub-normal, antes que occorra a morte do *rhesus* (Figs. 4 e 5). Ha casos ainda em que a molestia evolue durante dias após á inoculação de sangue virulento sem alterações thermicas notaveis; permanecendo a curva

quasi inalterada para só se elevar nos dous dias que precedem a morte do animal (Fig. 9).

Além das infecções com sangue humano tambem foi possivel obter a infecção dos *Macacus rhesus* por meio da picada de mosquitos que tinham sugado o doente 17 a 30 dias antes, sendo sufficiente, neste ultimo caso, um só mosquito para produzir uma infecção mortal no macaco.

Duas vezes tambem nos foi possivel obter a infecção de um *rhesus* pela inoculação de emulsões de mosquitos, experimentalmente infectados, sendo que uma dellas foi conseguida pela inoculação de emulsão de 10 *Aedes ægypti* que 5 dias antes haviam sugado um doente. Esta experiencia mostra que o virus da febre amarella existe no mosquito, em boas condições para infectar, antes que este seja capaz de transmittil-o por picada, isto é, que tenha virus no seu apparelho secretor salivar, o que confirma os resultados anteriormente obtidos na Africa por BAUER e HUDSON.

Nem todos os *Macacus rhesus* inoculados com o virus de outro *rhesus* anteriormente infectado apresentam uma molestia typica e vêm a morrer. Não poucos escapam depois de apresentarem alterações thermicas elevadas, dias seguidos, e chegarem a ter as urinas muito amarellas e carregadas de albumina como é a regra nos periodos adiantados da molestia no *rhesus*. Este facto talvez seja devido á virulencia ainda não bastante forte do virus ou talvez a uma outra causa ainda por esclarecer.

Como ja tivemos occasião de dizer, além do *Macacus rhesus* tambem pesquizámos a sensibilldade do virus amarillico para o *Macacus cynomolgus*, o *Macacus speciosus* e o *Pseudocebus azarae*.

O primeiro *Macacus cynomolgus* nós o infectámos inoculando-o com sangue de 2 doentes atacados de febre amarella benigna e o animal veio a morrer 8 dias depois com a fôrma typica da molestia, curva thermica caracteristica e lesões anatomopathologicas macro e microscopicas absolutamente eguaes ás dos *Macacus rhesus*. Um segundo *cynomolgus* inoculado com 0,2 cc. de sangue de um *rhesus* infectado morreu do mesmo modo que o anterior, 6 dias depois da inoculação, com lesões e curva thermica caracteristicas (Fig. 8).

Em ambos os casos se tratava de animaes adultos e muitos desenvolvidos. Temos a impressão de que o *cynomolgus* é um macaco tão sensivel quanto o *rhesus* á inoculação do virus humano ou de origem animal e pelo seu grande tamanho offerece vantagem para certas experiencias, pois não sómente póde fornecer grande quantidade de sangue como de orgãos, o que tem importancia no caso do preparo de vaccina anti-amarillica.

Da especie *Macacus speciosus* só tivemos um exemplar de 3 mezes de edade. Este macaco foi inoculado com a emulsão de figado de um *rhesus* que morrera de febre amarella e teve uma forma prolongada da molestia com algumas elevações thermicas (Fig. 5) e veio a morrer, ao cabo de 13 dias da inoculação, com lesões caracteristicas, porém mais discretas que as dos outros dous macacos já experimentados.

Quanto ao *Pseudocebus azarae* só tivemos occasião de inocular 2 exemplares; um com sangue de um doente com mais de 72 horas de molestia não teve reacção alguma; outro injectado com virus de *rhesus* teve febre durante varios dias, mas sacrificado, ainda durante o periodo febril, nada apresentou de suspeito pelo exame anatomopathologico de suas visceras.

Alem destas especies de simios não temos usado de outras nas experiencis até agora feitas.

As lesões anatomo-pathologicas nos macacos sensiveis á infecção amarillica, o *M. rhesus*, o *M. cynomolgus* e o *M. speciosus*, são de um modo geral as mesmas e em tudo identicas ás observadas nos macacos infectados com o virus africano, e muito semelhantes ás do homem, e como estas, absolutamente caracteristicas e constantes.

Estas lesões de um modo geral são as seguintes:

Ictericia pouco accentuada e só ás vezes notavel por uma cor ligeiramente amarellada da pelle e mucosas e pelo colorido da aorta. Hemorrhagias no estomago e intestino pódem ser encontradas especialmente nos casos em que a molestia é prolongada; ellas faltam ou são muito escassas e então quasi que limitadas ao estomago, nas formas agudas. Pequenas petechias podem ser observadas na pleura, no pericardio e endocardio. Coração em geral pallido e flaccido. Figado amarello camurça em muitos casos, em outros amarellado na totalidade do orgão, ou pardacento com áreas amarelladas mais ou menos extensas; lobulos visiveis e vasos injectados. O orgão é mais ou menos friavel e tem o seu colorido em dependencia com a gordura nelle contida.

Baço ligeiramente augmentado de volume com colorido vermelho escuro, ás vezes um tanto azulado. A superficie de secção é nitida, a polpa consistente e os glomerulos visiveis.

Rins um pouco augmentados, pardo amarellados mais claros que os normaes com a superficie de secção parda avermelhada e as camadas cortical e central distinctas. Capsula destacando-se bem. A bexiga contem, ás vezes, urina de colorido amarello intenso, rica de albumina e contendo cylindros hyalinos e granulosos.

O exame microscopico dos orgãos revela pequenas hemorrhagias no pulmão, coração, estomago e intestino em certos casos. No figado intensa degeneração gorda, necrose mais ou menos intensa das cellulas com alterações acidophilas do protoplasma e dos nucleos, pycnose e caryorrhexis. Não raro as cellulas perdem suas connexões normaes, outras apparecem com o aspecto de amebas. Os nucleos se córam mal e apparecem alterados na fórma. A necrose das cellulas occupa em geral a zona media do lobulo ao longo das traves de HENLE, mas póde se extender e apenas poupar a camada de cellulas que circumda o espaço porta. Infiltrações leucocytarias discretas no figado são frequentemente observadas.

No baço observa-se especialmente uma intensa hyperplasia dos folliculos e augmento das cellulas endotheliaes phagocytarias na peripheria do glomerulo. Nos rins a tumefacção turba lesões de nephrite aguda, degeneração gordurosa e necrose de cellulas; cylindros hyalinos e granulosos e as vezes os de calcio. No figado e rins as lesões são as classicas descriptas pelo Prof. ROCHA LIMA para a febre amarella humana.

A degeneração gordurosa existe em maior ou menor gráo em diversos orgãos, mas no cerebro se observa apenas congestão, não se notando a presença de gordura nas cellulas nervosas do macaco conforme verificações do Prof. JAKOB e Drs. AMADEU FIALHO e E. VILLELA.

As alterações nucleares das cellulas do figado estão sendo objecto

de estudos muito interessantes por parte de nosso collega Dr. MAGARINOS TORRES.

As lesões acima referidas, tanto as macro como as microscopicas, podem variar em intensidade conforme o caso e não faltam nos animaes que socumbem á infecção.

Quando porem se sacrificam os animaes no inicio do periodo thermico ou aquelles com baixa de temperatura post-febril mas inoculados com um virus ainda pouco activo e nos quaes provavelmente a molestia evoluiria para a cura, as lesões classicas do figado e rim podem faltar ou ser muito escassas.

Sempre porem que se sacrifica um animal tanto no periodo de hyperthermia como no de hypothermia mas cujo sôro sanguineo já está amarello devido aos elementos biliares nelle contidos e ha albumina na urina então não faltam as lesões de necrose do figado nem a nephrite, alem da classica degeneração gordurosa, etc.

As lesões anatomo-pathologicas dos macacos infectados com febre amarella no Brasil não differem das obtidas com o virus africano.

II

PESQUIZA DO VIRUS NO SANGUE E ORGÃOS DOS INDIVIDUOS FALLECIDOS DE FEBRE AMARELLA.

Tivemos occasião de pesquizar a virulencia do sangue e dos orgãos de amarellentos para o *Macacus rhesus* com material de 7 autopsias, feitas 1 a 4 horas após a morte, em individuos que tinham fallecido no 4º e 5º dia da molestia. Os macacos foram inoculados 1/2 a 2 horas após a autopsia, verificando-se, na occasião, por sementeiras, a ausencia de bacterias de associação secundaria nos orgãos, os quaes foram colhidos com a possivel asepsia e cujos fragmentos eram lavados em agua physiologica esteril, repetidas vezes, antes de serem usados. Uma parte do orgão depois de esmagada em um gral, com areia esteril, era diluida em 4 partes de agua physiologica, filtrada em gaze e a emulsão obtida servia então para as injecções nos macacos, por via subcutanea, na dose de 2 a 5 centimetros cubicos.

As inoculações foram feitas com sangue, figado, rim, baço, medulla ossea e cerebro. O figado foi injectado isoladamente em 3 *Macacus rhesus*, assim como o sangue e o rim em dous outros desses macacos. Quatro *rhesus* foram inoculados com mixturas de varios orgãos. Nenhum dos 9 animaes inoculados veio a morrer de febre amarella e dos que tiveram reacções febris dous que foram sacrificados nada apresentavam que fizesse suppor estarem infectados com o virus amarillico.

Tanto quanto se póde concluir por estes resultados parece que o virus da febre amarella não existe nem no sangue nem nos orgãos dos amarellentos, o que confirma o seu desapparecimento total, no organismo humano, depois do terceiro dia de molestia.

III

PESQUIZA DA *LEPTOSPIRA ICTEROIDES*.

Em 15 casos de febre amarella as pesquizas feitas para descoberta da *Leptospira icteroides* pela verificação microscopica, isolamento em cul-

tura e pela inoculação em cobayas jovens do mais variado material, sangue, urina, de doentes em diversos estadios da molestia, assim como material colhido nos orgãos de cadaveres, figado e rim, alem de sangue e urina, todas deram resultados negativos. Os exames a fresco do material, em campo escuro, as impregnações e colorações não tiveram o minimo successo.

As cobayas inoculadas quando apresentavam temperaturas elevadas foram sangradas no coração ou sacrificadas sendo o seu sangue e emulsões de orgãos inoculados a outros animaes novos. As reacções febris nas cobayas porém, desapparecem ao cabo de 3 pasagens como já foi observado por STOKES, BAUER e HUDSON. No sangue e orgãos de taes animaes não se encontram *Leptospiras*. Tambem resultaram negativas as inoculações de sangue e orgãos de macacos em cobayas e tambem não deram resultados os exames directos para *Leptospiras* nesses animaes.

A prova de PFEIFFER, feita com 8 sôros differentes, provenientes de doentes com 8 a 15 dias de convalescença, resultou negativa *in vivo* em cobayas novas, quer com a *Leptospira icteroides* isolada na Bahia por NOGUCHI e seus collaboradores (raça Palmeira) quer com uma raça de *Leptospira icterohœmorrhagiæ*, continuando ambos os parasitas vivos, até 2 horas depois da experiencia, no peritoneo de cobayas injectadas com 1/2 cc. de sôro e 1/2 cc. de cultura.

Diante dos resultados negativos de todas estas pesquizas alliadas a outras anteriormente obtidas por diversos auctores na Africa (STOKES, BAUER e HUDSON, MATHIS e SELLARDS) e tambem no Brasil no homem (GOMES DE FARIA, MARQUES DA CUNHA, OLYMPIO DA FONSECA, BORGES VIEIRA, BURLE DE FIGUEIREDO) se póde concluir que a *Leptospira icteroides* não desempenha papel etiologico na febre amarella. Muito provavelmente a *Leptospira icteroides* figura nos casos em que foi isolada como um germe de associação secundaria provindo talvez do intestino nos individuos que ingerem aguas de má qualidade e polluidas por *Leptospira*.

Esta hypothese nos parece provavel em vista do isolamento, cada vez mais frequente, de *Leptospiras* pathogenicas para cobayas, directamente das aguas de minas, arrosaes, poços, etc., o que torna muito provavel que esses germes levados ao tubo digestivo com as aguas contaminadas passem ulteriormente para o sangue em certos estados infectuosos graves como a febre amarella.

Menos provavel nos parece a hypothese de que entre os casos de febre amarella estudados por NOGUCHI e seus collaboradores houvessem alguns de molestia de WEIL que não foram identificados e dos quaes tivesse isolado a *Leptospira* que foi denominada de *icteroides*.

IV

IDENTIDADE DA FEBRE AMARELLA AFRICANA E SUL AMERICANA.

Os trabalhos realizados entre nós durante a actual epidemia de febre amarella, nas condições as mais favoraveis, permittem excluir, segundo pensamos, o papel etiologico da *Leptospira icteroides* na febre amarella. Tambem na Africa os resultados a este respeito foram absolutamente negativos de modo que se póde concluir que nenhuma differença etiologica

existe entre as duas molestias, tanto a que reina na Africa como aqui entre nós, ambas devidas a um virus ainda desconhecido.

A identidade entre as duas molestias está, de resto, perfeitamente estabelecida pelos seus aspectos clinicos, lesões anatomo-pathologicas, epidemiologica e por terem ambas, praticamente, um só transmissor, o *Aedes ægypti*.

As experiencias aqui feitas vieram demonstrar que o *Macacus rhesus* era sensivel ao virus americano da mesma forma que ao virus africano, o que ainda mais identifica as duas molestias.

A estas provas ainda podemos juntar mais uma que é a da immunidade cruzada entre o virus africano e a americano.

Tendo o Dr. CARLOS CHAGAS trazido do Instituto Pasteur, conservados em gelo, fragmentos de figado de *rhesus* infectado com o virus africano, o material foi aqui inoculado 20 dias depois num *rhesus* e ulteriormente em outro. O primeiro macaco teve uma reacção febril de 40º no 5º dia e o segundo não teve reacção febril accentuada, parecendo que o virus perdera a virulencia ou a tinha já tão attenuada que era incapaz de causar a morte do animal.

Era de suppôr porêm, que esse virus embora attenuado fosse sufficiente para dar aos *rhesus* uma immunidade contra a inoculação de um virus homologo. De facto foi isto que se verificou, e os dous *Macacus rhesus* acima mencionados, injectados com uma emulsão de figado de *rhesus* infectado com o virus, aqui isolado, nenhuma reacção tiveram, ao passo que um testemunha morria em 7 dias, o que demonstra que a primeira inoculação com o material africano, embora sob uma fórma attenuada, fôra sufficiente para o proteger contra o nosso virus demonstrando a identidade delles.

V

TENTATIVAS PARA OBTER UM DIAGNOSTICO SOROLOGICO DA FEBRE AMARELLA.

Uma questão da mais elevada importancia na febre amarella é se conseguir um methodo seguro para o seu diagnostico, dado o grande numero dos casos que evoluem atypicamente, e dos que, por sua benignidade, não se differenciam de uma grippe banal, e que por esse facto e pela sua infecciosidade são mais perigosas sob o ponto de vista hygienico. Dahi o interesse que ha em descobril-os a tempo. Com esse objectivo procurámos, desde o começo de nossos trabalhos sobre febre amarella experimental, verificar si não seria possivel obter um diagnostico sorologico do mal, usando do desvio do complemento.

Pondo em pratica este methodo, empregámos ao começo, como antigeno, o sôro de doentes no 1º e 2º dias de molestia, na dose de 0,5 cc., e como anticorpo o sôro de convalescentes com 8 a 15 dias, na dose de 0,2 a 0,5 cc. O complemento empregado foi o de cobaya e como systema hemolytico usámos o sôro de coelho anti-carneiro e globulos de carneiro, lavados.

Os resultados das experiencias em 8 doentes convalescentes tendo sido negativos resolvemos substituir o antigeno, sôro de doente no inicio da molestia, por um extracto phenicado de figado de *rhesus*, preparado

emulsionando-se 5 grammas de polpa do figado, finamente esmagada, em 100 cc. de agua physiologica phenicada a 0,5%. A emulsão assim feita era filtrada em papel, depois deixada em repouso durante alguns dias, sendo então verificado o seu poder impediente. Este antigeno foi empregado na dose de 0,2 a 0,4 cc. com os mesmos sôros de convalescentes anteriormente usados, não dando, porem, resultado positivo algum.

Os resultados até agora obtidos nas experiencias de desvio do complemento não têm sido absolutamente favoraveis, mas é possivel que, com outras technicas, se chegue afinal ao resultado desejado.

O sôro dos amarellentos nenhuma influencia tem sobre as reacções de WASSERMANN que permanecem negativas e, tanto no começo como na convalescença da molestia, quando antecedentes de syphilis podem ser excluidos como podémos verificar em 8 casos por nós observados.

Como elemento para estabelecer um diagnostico de febre amarella ainda se pode aproveitar, em certos casos, as propriedades preventivas que adquire o sôro dos individuos que se curam da molestia.

O sôro de convalescente previne facilmente a infecção do macaco, como demonstram STOKES, BAUER e HUDSDN, ao passo que 2 c.c. de sôro de homem normal não têm acção alguma. Assim sempre que estivermos diante de um caso suspeito de ter sido de febre amarella, mas que pela benignidade ou por ter sido visto tardiamente não permittiu um diagnostico preciso, podemos esclarecel-o de um modo relativamente facil, pesquizando as propriedades preventivas do sôro. Tomam-se 2 c.c. de sôro do individuo suspeito ou injecta-se como elle um *Macacus rhesus*, 24 horas depois inocula-se o mesmo animal com uma dose mortal de virus e se elle não adquirir a molestia é que o sôro usado é preventivo e ha toda a probalidade senão certeza de que o caso tenha sido de febre amarella; si, pelo contrario, o animal adoecer se deverá considerar o caso como negativo. Este é um methodo a experimentar e que póde prestar serviços ao hygienista, esclarecendo certos casos duvidosos, permittindo a filiação de uns casos a outros e fornecendo ao hygienista dados epidemiologicos mais precisos e muito proveitoso em certos casos.

O processo já foi usado em tres casos de certa importancia epidemiologica nesta cidade, observando-se em dous delles, resultados positivos com a verificação das propriedades preventivas do sôro dos individuos suspeitos e no terceiro caso foi a prova considerada negativa e excluida a suspeita de febre amarella por não ter o sôro protegido o *rhesus* contra a inoculação do virus. Foram de grande utilidade para os trabalhos epidemiologicos da Saúde Publica os reultados obtidos com o emprego deste processo de diagnostico para o esclarecimento dos tres casos acima referidos.

VI

VACCINAÇÃO CONTRA A FEBRE AMARELLA.

A vaccinação contra a febre amarella póde ser feita por dous methodo diversos, tanto pela immunização passiva por inoculação de sôro de convalescentes ou de um macaco immunizado por inoculações repetidas de material virulento, como pela inoculação de uma vaccina preparada com sangue ou orgãos de macacos infectados.

Temos empregado muitas vezes o sôro de convalescentes como methodo de protecção passageira contra a infecção. Primeiramente elle foi usado em Manguinhos para proteger aquelles que trabalhavam nos laboratorios com macacos infectados e ulteriormente o seu emprego foi ampliado a pessoas que habitam os fócos e á outras que se queriam proteger contra qualquer eventualidade. Orça por 50 a 60 as pessoas assim protegidas, tendo todas supportado bem as injecções que, só num ou noutro caso, produziram uma certa depressão passageira, toda individual. O sôro usado foi o de pessoas que estavam com 15 dias a 1 mez de restabelecimento de ataques benignos e graves da molestia. Entre as pessoas assim protegidas contra a febre amarella nenhum caso da molestia occorreu até agora, sendo usados nellas 1 a 2 c.c. de sôro. por via subcutanea, como dóse vaccinante.

O emprego do sôro de convalescentes é, no emtanto, de uso limitado, dadas as difficuldades que ha em obtel-o em grandes quantidades para emprego em mais larga escala.

Estamos immunizando, com sangue e orgãos de *rhesus* infectados, 1 cavallo e 2 carneiros e 6 rhesus, com o fim de obter delles um sôro que tenha eventualmente, uma acção immunizante sufficiente, de modo que elle possa ser com vantagem mais largamente usado, em certos fócos da molestia.

E' possivel tambem que o sôro de animaes immunizados cuja acção preventiva acaba de ser demonstrada no Intituto Pasteur de Paris, tenha tambem uma acção curativa efficaz no homem, quando empregado nos primeiros dias de molestia e em grandes quantidades.

A vaccina contra a febre amarella, destinada a ter o maior successo, é evidentemente a preparada com emulsão de orgãos de *Macacus rhesus* ou *cynomolgus* infectados e esterilizados por algum dos processos conhecidos.

A commissão franceza do Instituto Pasteur já havia demonstrado que o sôro aquecido, de um doente nos primeiros dias da molestia, quando o virus está presente nelle, tinha uma acção vaccinante evidente, em relação á infecção amarillica no homem. Era portanto de esperar que os orgãos do *Macacus rhesus* ou *cynomolgus* cheios de virus offerecessem condições muito favoraveis para o preparo de uma vaccina, e assim, desde que infectamos o primeiro *Macacus rhesus*, aproveitamos os orgãos do animal para preparla-a, reduzindo-os a uma polpa que, depois emmulsionada em agua esterilisada na proporção de 1: 9, foi filtrada em gaze e esterilisada pelos vapores de formol, seguindo a technica por nós usada desde 1911 para esterilisar a vaccina contra a espiroquetose das gallinhas.

Já estava a vaccina preparada e em experiencias no *rhesus* e no homem, quando recebemos o trabalho de HINDLE relatando seus interessantes e precursores trabalhos com as vaccinas por elle usadas contra a febre amarella, uma simplesmente formolada, outra glycerinada e phenicada, usando em ambas uma parte de figado para quatro da solução esterilisante, no primeiro caso formol a 1‰, e no segundo uma solução de 60% de glycerina em agua phenicada a 0,5%.

Resolvemos então preparar a vaccina glycerinada e phenicada, como recommenda HINDLE, e para comparação com esta, uma outra formolada a 2‰ e phenicada a 0,5%, visando obter nesta uma garantia mais perfeita de esterilidade em relação á bacterias e bolores, sem prejuizo da conser-

vação do virus. Estas duas vaccinas deram bons resultados nos *rhesus*, protegendo-os contra infecções experimentaes, e foram, por isso, experimentadas no homem.

Como a vaccina glycerinada se tivesse revelado mais dolorosa, começamos a usar no homem, em larga escala, a vaccina phenicada e formolada que é muito mais supportavel, dóe apenas um pouco, no momento da inoculação e não dá reacção ulterior.

A technica que actualmente usamos para o preparo da vaccína é a seguinte: Infecta-se um *rhesus* ou *cynomolgus* sadios, com uma quantidade certamente mortal do virus, e quando o animal, depois de ter a elevação thermica caracteristica, entra na phase de hypothermia e, ás vezes, antes mesmo della, é elle sacrificado pelo chloroformio. Os orgãos são immediatamente retirados com a maxima asepsia, usando-se no preparo da vaccina, o figado, rins, baço e cerebro, que são collocados em grandes placas de PETRI esterilisadas e cuidadosamente examinados. Uma vez reconhecido que estão perfeitamente sadios, são lavados em agua physiologica, enxutos em papel de filtro esteril e pesados.

Em seguida são os orgãos cortados em pequenos fragmentos que se collocam em um gral com areia lavada esteril, sendo então esmagados cuidadosamente. Isto feito, addiciona-se a uma parte de orgão, 5 de agua distillada esterilisada formolada a 2 por mil e phenicada a 0,5% agitando-se e descollando o material até obter uma emulsão fina e homogenea, que é filtrada em 4 folhas de gaze e recebida em um balão esteril. Este filtrado é a vaccina, que se colloca então durante 5 dias na geladeira, verificando-se, depois desse prazo, se sua esterelidade é completa por meio de sementeiras em meios anaerobios e aerobios e inoculação de 0,5 cc. em 2 cobayas.

Desde que os meios de cultura permanecem estereis, a vaccina é distribuida em empolas com os cuidados habituaes e semeada de novo. Si sua esterilidade é perfeita e se as cobayas, decorrido o prazo, permanecem sadias, é a vaccina considerada prompta para o emprego no homem.

A dóse que está sendo usada no homem adulto é de 2 c.c. por via subcutanea, tendo-se o cuidado de agitar a empola para emulsionar o material nella contido, que se deposita quando em repouso.

A vaccina formolada e phenicada, preparada como acima ficou, dito é um liquido roseo amarellado, turvo, dando um pequeno deposito e não tendo cheiro desagradavel, nem se sentindo o do formol ou do acido phenico nella contidos.

Esta vaccina começou a ser usada no Instituto Oswaldo Cruz entre as pessoas que nelle trabalham em febre amarella, e não tendo dado reacções desagradaveis, começou a entrar em uso corrente, e o Departamento de Saúde Publica já recebeu e a está empregando em maior escala, em pequenos fócos isolados de febre amarella e no Estado do Rio, podendo-se calcular que o total de pessoas vaccinadas já excede a tresentas. Ella tem sempre sido bem supportada. Não deu reacções incommodas e, entreos vaccinados, não houve caso algum de febre amarella, mas tratando-se de uma observação em pequena escala, não se pode ainda ter opinião definiva a respeito.

Actualmente cerca de 2 mil dóses de vaccina estão promptas para as experiencias á serem feitas pela Saúde Publica.

Com o proseguimento das experiencias de Laboratorio com a vaccina, e com o seu emprego em maior escala na pratica, é de esperar que se chegue, dentro em pouco, a resultados seguros sobre as suas vantagens praticas, tempo de conservação, duração da immunidade, etc.

São estes, em resumo, os resultados á que, até agora, chegamos nestas pesquizas sobre a febre amarella no Rio de Janeiro.

Fig. 1—*Macacus rhesus* normal.
Fig. 1—Normal *Macacus rhesus*.

Phot. J. Pinto.

Fig. 2—*Macacus rhesus* doente em periodo adeantado de hypothermia. Temp. 36º,2.
Fig. 2 *Macacus rhesus*, ill, within the advanced period of hypothermy. Temp. 36º,2.

Phot. J. Pinto.

Fig. 3—*Macacus rhesus* doente, em coma, prestes a morrer. Temp. 33°,4.
Fig. 3—*Macacus rhesus*, ill, in collapse, about to die. Temp. 33°,4. Phot. J. Pinto.

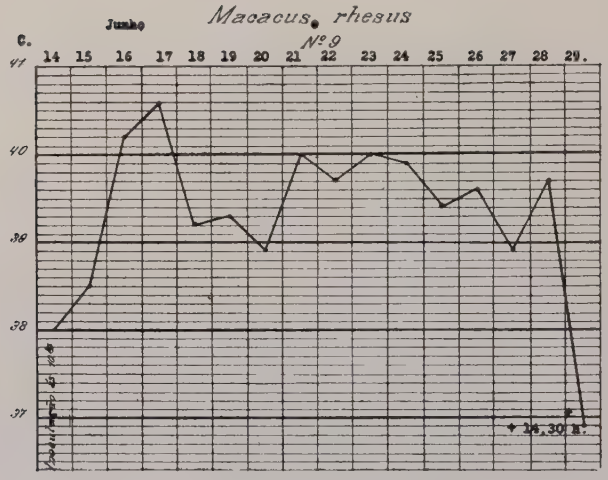


Fig. 4 Curva thermica do *rhesus* 9. Infectado com 4 c.c. de sangue humano (casos benignos), com menos de 48 horas de molestia.

Fig. 4 Thermic curve of the *rhesus* 9. Infected with 4 c.c. of human blood (slight cases), with less than 48 hours of duration.

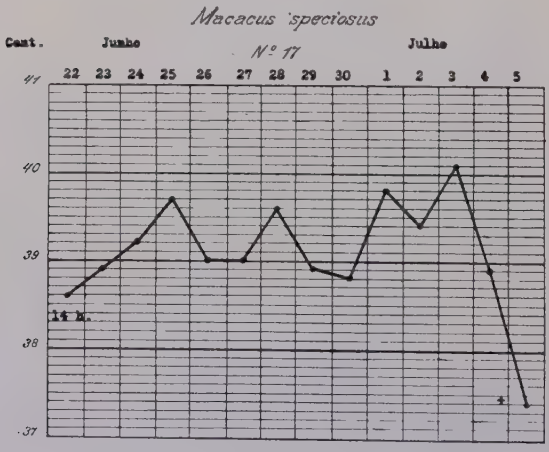


Fig. 5 -Curva thermica do *Macacus speciosus*. Infectado com 1 c.c. de emulsão de figado do *rhesus* n. 8.

Fig. 5—Thermic curve of the *Macacus speciosus*. Infected with 1 c.c. of emulsion of the liver of *rhesus* n. 8.

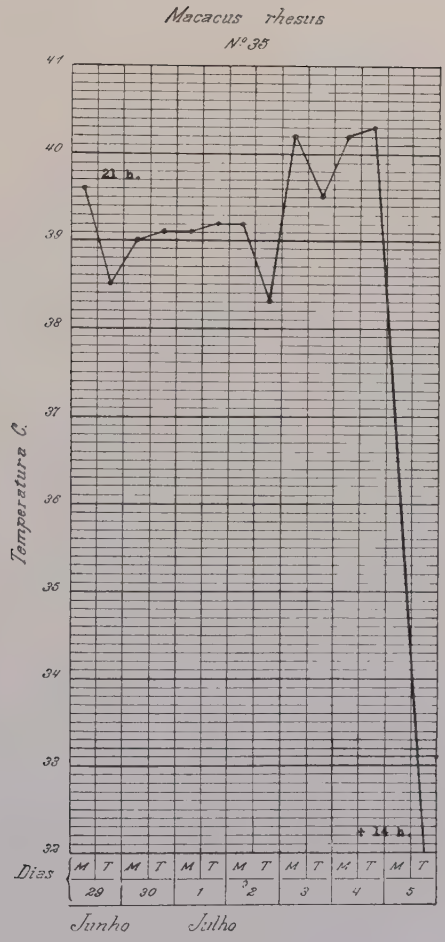


Fig. 6 Curva thermica do *rhesus* n. 35. Infectado por mosquitos que tinham picado, 17 dias antes, um doente com 29 horas de molestia.

Fig. 6 Thermic curve of the *rhesus* n. 35. Infected by mosquitoes, which had bitten, 17 days before, a patient with 29 hours illness.

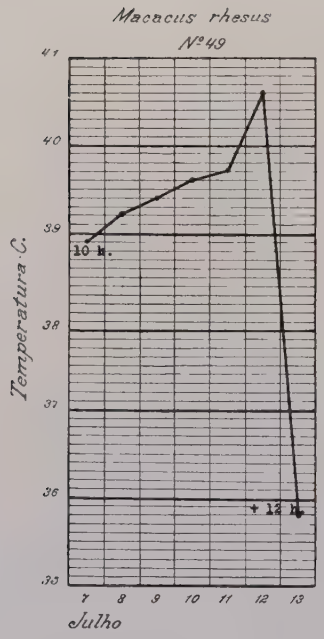


Fig. 7—Curva thermica do *rhesus* n. 49., Infectado com 2 c.c. de sangue citratado do *rhesus* n. 35.

Fig. 7—Thermic curve of the *rhesus* n. 49. Infected with 2 c.c. citrated blood of the *rhesus* n, 35.

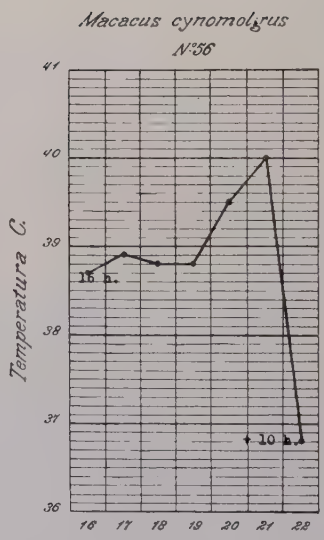


Fig. 8—Curva thermica do *cynomolgus* n. 56. Infectado com 1/2 c.c. de sôro do *rhesus n. 49.*

Fig. 8—Thermic curve of the *cynomolgus* n. 56. Infected with 1/2 c.c. of Serum from *rhesus* n. 49.

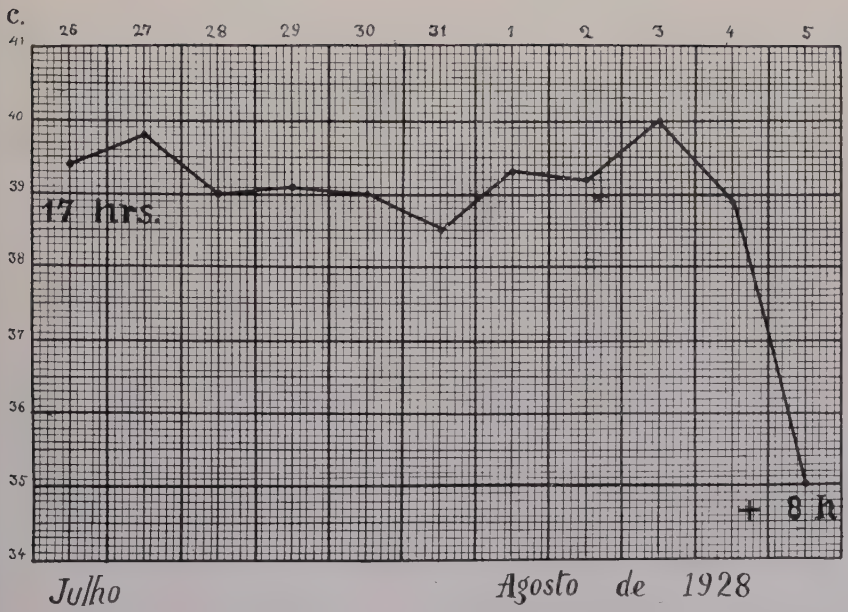


Fig. 9—Curva thermica do *rhesus* n. 76. Infectado com 0,2 c.c. de sôro do *cynomolgus* n. 56.

Fig. 9—Thermic curve of the *rhesus* n. 76. Infected with 0,2 c.c. of serum from the *cynomolgus* n. 56.

Report upon some researches on Yellow Fever.

By Dr. HENRIQUE DE BEAUREPAIRE ARAGÃO

(Chief Service)

The cases of yellow fever, which lately occurred in Rio de Janeiro offered us an opportunity for a series of experimental researches on the subject, the result of which are the reason of the present work.

Before relating them, we avail ourselves of this opportunity to tender herewith our best thanks to Drs. CLEMENTINO FRAGA, ROCHA LIMA, FREDERICO SOPER, NELSON DAVIS, JOHANNES BAUER, BARROS BARRETO, SINVAL LINS, BRUNO PESTANA, RAUL DI PRIMIO, AMADEU FIALHO, ARRUDA BOTELHO, CARLOS DRUMMOND, as also to Drs. CARLOS CHAGAS, ALCIDES GODOY and to all our colleagues, companions of Manguinhos, for the valuable help lent to us, in various manners, for these investigations.

The subjects we were more immediately interested in, were the following:

I. Transmission of the yellow fever to monkeys.
II. Researching the virus in the blood and organs of persons who died from yellow fever.
III. Research of the *Leptospira icteroides* in the patient, in the corpse, and in infected monkeys.
IV. Identity of the African and American yellow fever.
V. Serological diagnostics of yellow fever,
VI. Vaccination against yellow fever.

I

TRANSMISSION OF YELLOW FEVER TO MONKEYS.

The discovery, by STOKES, BAUER and HUDSON, that yellow fever in Africa was transmissible to the *Macacus rhesus*, opened a wide field to experimental researches on the subject, in which up to the present, only the experiments tried in man had been undoubtedly successful. The yellow fever cases in Rio de Janeiro, offered an opportunity for us to also make attempts to transmit the American disease to a few kinds of monkeys, making use, up to now, to that object, of specimens of the following species: *Macacus rhesus*, *Macacus cynomolgus*, *Macacus speciosus* all of these, of Asiatic origin, and of the common Brazilian species *Pseudocebus azarae*.

The three first species proved sensible, for it was possible to cause in same, the yellow fever infection, as well by inoculating human blood, as by the biting or inoculations of mosquitoes experimentally infected through patients, as also by inoculating into animals of these kinds, blood and organs of monkeys, infected at the laboratory.

temperature, before the *rhesus* dies (figs. 4 & 5). There are besides cases in which the illness evolves for days subsequent to the inoculation of virulent blood, without serious thermic alterations; the curve remains almost inaltered and only rises during the two days before the animal dies (fig. 9).

Besides the infections with human blood, it has been possible to get the infection of the *Macacus rhesus* through the sting of infected mosquitoes which had sucked a patient 17 to 30 days before, being in this last case sufficient one mosquito to cause the monkey a mortal infection.

We also succeeded twice in obtaining the infection of a *rhesus* by inoculating emulsions op mosquitoes, experimentally infected. In the first case, we got at this result, inoculating an emulsion of 10 *Aedes ægypti* which, 5 days ago, had sucked a patient. This experiment shows that the virus yellow fever exists in the mosquito, suitable for infection, prior to this being able to transmit it, by stinging, that is to say, before it has virus in the salivary glands, which confirms the results previously obtained in Africa by BAUER and HUDSON.

Not all the *Macacus rhesus* inoculated with the virus of another *rhesus* infected before, show a typical illness and happen to die. Lots of them escape, after having shown high thermic alterations and very yellow urines, charged with albumin, as in the rule in the advanced stages of the illness in *rhesus*. This fact should perhaps be ascribed to the still not strong enough virulence of the virus or may-be, to another still unknown cause.

As we had already an opportunity to say, besides the *Macacus rhesus*, we also tested the sensibility to the yellow fever virus, of the *Macacus cynomolgus*, *Macacus speciosus* an the *Pseudocebus azarae*.

The first one, the *Macacus cynomolgus*, was infected by us, inoculating it with blood of two patients with a slight yellow fever, and the animal happened to die after 8 days with a typical form of the disease, a characteristical curve and macro and microscopic anatomopathological lesions, quite identical to those of the *Macacus rhesus*. A second *cynomolgus*, inoculated with 0,2 c.c. of blood from an infected *rhesus* died in the same way as the former, 6 days after the inoculation, with characteristical lesions and thermic curve (Fig. 8).

In both cases, we dealt with adult and very developed animals. We have a feeling that the *cynomolgus* is a monkey as sensible as the *rhesus* to the inoculation of human or animal virus, and owing to its big size, offers an advantage for certain experiments, as it is able, not only to provide a large quantity of blood but also of organs, which is of a great importance in the case of preparation of anti-yellow fever vaccine.

Of the kind *Macacus speciosus* we only had a specimen 3 months old. This monkey was inoculated with an emulsion of the liver from a *rhesus* which had died from yellow fever. It had a longlasting form of the disease, with a few thermic rises (fig. 2) and happened to die, after 12 days inoculation, showing characteristical but less acknowledged lesions than the two other already experimented.

As regards the *Pseudocebus azarae*, we had opportunity to inoculate only 2 specimens; one with the blood of a patient with 72 hours illness; there was no reaction; another one, injected with virus of a *rhesus*, had a

fever during several days, but, having been sacrificed still during the febrile stage, it did not reveal anything suspect, according to the anatomopathological examination of its viscera.

Besides those kind of monkeys, we did note use any other in the experiments effected till now.

The anatomopathological lesions in monkeys sensible to yellow fever infection, the *M. rhesus*, the *M. cynomolgus* and the *M. speciosus*, are in a general way the same and wholly identical to these observed in monkeys infected with African virus, and most similar to the lesions in man, and like these absolutely caracteristical and constant.

These lesions are, as a rule, the following:

Slightly accentuated jaundice, in few cases only to be noted by a slightly yellowish colour of the skin and the mucosae and by the shade of the aorta. Hemorrhages in the stomach and intestines may be observed, specially in cases when the illness is a longlasting one; they miss or seldom appear, and then, in acute forms, seem to be limited to the stomach. Slight petechiae can be observed in the pleura, in the pericardium and the endocardium. Heart generally pale and flaccid. Liver of a shammy colour in many cases, in other ones yellowish in the whole of the organ, or greyish with more or less extensive yellowish spots, lobules visible and vessels injected. The organ is more or less friable, its colour being in relation to the fat it contains.

Spleen slightly enlarged in volume, with dark red, sometimes rather blueish shade. The area of the section is neat, pulp consistent, and glomeruli visible.

Kidneys a little increased, yellowish grey, of slighter colour than the normal ones, with a reddish grey section area on the cortical and central coats distinct. The capsule appears clearly. The bladder contains sometimes an intense yellow coloured urine, rich in albumin carrying hyaline and granulated casts.

The microscopic examination of the organs reveals slight hemorrhages in the lung, heart, stomach and intestine in a few cases. In the liver, intense fatty degeneration, a more or less strong necrosis of cells with acidophilous alterations of the protoplasma and pycnosis of the nucleus, and caryorrhexis. Not seldom, the cells lose their normal connections, other appear with an aspect of amebas. The nuclei do not colour well and seem to be altered in shape. The necrosis of the cells occupies generally the medium zone of the lobule all along the HENLE's layers, but may extend further and spare only the coat of cells surrounding the portal space. Slight leucocytarian infiltrations in the liver are frequently observed.

In the spleen, an intense hyperplasia of the follicles and increase of the phagocytarian endothelial cells in the periphery of the glomerule is to be observed. In the kidneys the tumefaction troubles lesions of acute nephritis, fatty degeneration and necrosis of cells. Hyaline and granulous casts, sometimes those of calcium. In the liver and kidneys, the lesions are the classical as discribed by Prof. ROCHA LIMA for yellow fever in man.

The fatty degeneration is to be observed, on a more or less large scale, in several organs, but in the brain, hardly a congestion is observed, without nothing the presence of fat in the nervous cells according to what

was controlled by Prof. JAKOB and Drs. AMADEU FIALHO and E. VILLELA.

The nuclear alterations of the liver cells are being the object of very interesting studies on the part our colledgue Dr. MAGARINOS TORRES.

The above stated lesions, as well the macro as the microscopic ones, may be of varying intensity, according to the case, and do not miss in animals which die from the infection.

When however, the animals are sacrificed in the beginning of the fever period, or other are with low post-thermic temperature fall, but have been inoculated with a still little active virus, and in which probably the illness would be likely to evolve towards curing, the classic lesions of the liver and kidneys, may miss or be very rare.

Every time however, an animal is sacrificated, when in the period of hyper or hypothermy, but whose serum is already yellow owing to biliar elements contained in it, and whenever there is albumin in the urine, then there is no lack of lesions of liver necrosis nor of the nephritis besides fatty degeneration, etc.

The anatomo-pathologic lesions of the monkeys infected with yellow fever in Brazil, show no difference with those obtained with the African virus.

II

RESEARCH OF THE VIRUS IN BLOOD AND ORGANS FROM PERSONS WHO DIED FROM YELLOW FEVER.

We had an opportunity of prospecting the virulence of the blood and the organs of yellow fever patients to the *Macacus rhesus* with material from 7 autopsies, effected 1 to 4 hours post mortem, in persons who had died on the 4th and 5th day of the illness. The monkeys were inoculated, half an hour to two hours, after the autopsy, having been controlled, by this opportunity, by means of culture, the complete lack of bacteria of secundary association within the organs, which were gathered with all possible aseptic care, the fragments of which were repeatedly washed in sterile physiologic water, before waking use of them. One part of the organ, after having been squashed in a mortar with sterile sand, was diluted with 4 parts of saline solution, filtrated through gauze and the emulsion thus obtained served then for injections to the monkeys, subcutaneously, at a dosis of 2 to 5 cubic centimeters.

The inoculations were made with blood, liver, kidneys, spleen, bone marrow and brain. The liver was injected isolatedly to 3 *Macacus rhesus*, as well as the blood and kidney to two other of these monkeys. Four *rhesus* were inoculated with mixtures, of various organs. None of the 9 inoculated animals happened to die from yellow fever, and of those which experienced febrile reactions, two which were sacrificed, would show nothing from which might be supposed they were injected with yellow fever virus.

Anyhow, as far one may conclude from these results, it seems that the virus of yellow fever does not exist either in the blood or in the organs of yellow fever patients, which confirms its total desappearing in the human organism after the third day of the illness.

III

RESEARCH OF THE *LEPTOSPIRA ICTEROIDES*

In 15 cases of yellow fever, the researches intended to discover the *Leptospira icteroides* through microscopic verification, isolating in culture and through inoculation to animals of the most varied material, blood, urine of patients at different stages of the illness, as well as material gathered in organs of corpses, liver and kidney, besides blood and urine, all provided negative results. The examinations in fresh material in dark field, impregnations and colouring did not prove the least successful.

The inoculated Guinea pigs who showed high temperatures were bled off at heart, or sacrificed, their blood and emulsions of their organs being inoculated to other young animals. The reactions, on the young Guinea pig however, disappear at the end of 3 passages as was already observed by STOKES, BAUER and HUDSON. In the blood and organs of such animals, no *Leptospira* is to be found. Also negative have remained the inoculations of the blood and organs of monkeys to Guinea pigs, and also without a result remained the direct examinations about *Leptospiras* in these animals.

PFEIFFER's reaction effected with 8 different serums proceeding from patients with 8 to 15 days convalescence, remained likewise negative in vivo in young Guinea pigs, either with the *Leptospira icteroides* isolated in Bahia by NOGUCHI and his collaborators (Palmeira race) or with a race of *Leptospira icterohaemorrhagiae*, both parasites continuing alive, still 2 hours after the experiment, in the peritoneum of Guinea pigs injected with 1/2 c.c. of serum and 1/2 c.c. of culture.

In view of the negative results of these researches allied to those previously obtained in Africa (STOKES, BAUER and HUDSON, MATHIS and SELLARDS) as also in Brazil in man (GOMES DE FARIA, MARQUES DA CUNHA, OLYMPIO DA FONSECA, BORGES VIEIRA, BURLE DE FIGUEIREDO) we may conclude that the *Leptospira icteroides*, does not play any etiologic part in yellow fever. It is most probable the *Leptospira icteroides* appears in the cases in which it has been isolated, as a germ of secundary association, perhaps proceeding from the intestine of persons who ingest waters of bad quality and spoilt by *Leptospira*.

This hypothesis appears to us as being probable in view of the isolating, every time more and more frequent, of *Leptospiras*, pathogenic to Guinea pigs, directly from mine waters, pools, wells, etc. which renders it most probable, that such germs, being brought into the digestive tube through polluted waters, pass afterwards into the blood, in certain severe infectious cases like yellow fever.

As less probable would appear the hypothesis that, amongst the cases of yellow fever studied by NOGUCHI and his collaborators, there could exist some ones of the WEIL's disease, which would not have been identified and in which, he would have isolated the *Leptospira* which was that named *icteroides*.

IV

IDENTITY OF AFRICAN AND SOUTH AMERICAN YELLOW FEVER

The works realized between us during the actual epidemic of yellow

fever, under the most favourable conditions, enable us to leave aside, as far as we many believe, the etiologic part of the *Leptospira icteroides* in yellow fever. Also, in Africa, the results in this respect, were absolutely negative, so that, we may conclude that no etiologic difference exists between the two diseases, either the one reigning in Africa or the other existing among us, both being caused by a still unknown virus.

The identity between both diseases, is, besides, thoroughly established, by its clinic aspects, anatomo-pathologic epidemiologic lesions, as also because both are practically caused by a unic transmissor, the *Aedes ægypti.*

The experiments effected here have shown that the *Macacus rhesus* was sensible to the American, in the same manner as to the African virus, which still firmer identifies both diseases.

To these proofs we may still add one more, this one being the cruised immunity between the African and the American virus.

Dr. CARLOS CHAGAS having brought from the Pasteur Institute, preserved in ice, fragments of liver from *rhesus* infected with African virus, this material was inoculated 20 days later to a *rhesus* and further to another one. The first monkey had a febrile reaction of 40º on the 5th day, and the second had no accentuated febrile reaction, the virus either having lost its virulence, or having such so attenuated as to be unable to cause the animal's death.

It thus gave way to suppose, that this virus, however attenuated, would be sufficient for conferring the *rhesus* immunity against the inoculation of an homologue virus. It was in fact, what was controlled, and the two above mentioned *Macacus rhesus*, being injected with an emulsion of liver of a *rhesus* infected with the virus isolated here, underwent no reaction, whereas a witness died within 7 days, which demonstrates that the first inoculation with the African material, however in attenuated form, was sufficient to protect it against our own virus, thus proving their identity.

V

ATTEMPTS TO OBTAIN A SEROROLOGIC DIAGNOSIS OF YELLOW FEVER.

A question of the highest importance in yellow fever is to succed in obtaining a sure method for its diagnosis, being given the high number of cases which evolve atypically, and of those which, owing to their benignancy do not differ from a common influenza and which for this reason and their infectiousity are more dangerous, under the hygienic point of view. Hence the interest there is in discovering them in time. For this purpose, we have tried, since the beginning of our researches about experimental yellow fever, to verify whether it could not bepossible to obtain a serologic diagnose of the illness, in making use of the fixation complement test.

Putting this method in practice, we used, in the beginning, as an antigen, the serum of patients in the 1st and 2nd days of the illness, at a dosis of 0.5 c.c. and, as an antibody, the serum of convalescents of 8 to 15 days, at a dosis of 0.2 to 0.5 c.c. The complement we used was that of Guinea pig and as a hemolytic system, we made use of rabbit anti-sheep serum and washed sheep's red cells.

The results of the experiments in 8 convalescent patients having been negative, we decided to substitute to the antigen, serum of a patient at the beginning of the disease, a phenicated extract of *rhesus* liver, prepared by emulsionating 5 grams of liver pulp, finely triturated, in 100 c.c. of saline solution, phenicated at 0,5%. The emulsion thus obtained was filtrated on paper, afterwards left to rest for a few days, being then controlled its preventive power. This antigen was used at a dosis of 0.2 to 0.4 c.c. with the same serums of convalescents as used in the former case, still not giving the least positive result.

The results got at till now in experiments by mean of deviation of complement have not been absolutely favourable, but it is possible that, using other technic methods, the viewed aim will be at last reached.

The serum of convalescent has no influence whatever on the WASSERMANN's reactions, which remain negative and as well at the beginning as during the convalescence of the illness, when syphilitic antecedents are not to be thought of, as we have been able to make certain in 8 cases we observed.

As an element for establishing a diagnosis of yellow fever, we can still avail ourselves, in certain cases, of the preventive properties acquired by serum from persons having recovered from the illness.

The serum of convalescent prevents easily the infection of the monkey, as demonstrated by STOKES, BAUER and HUDSON, whereas 2 c.c. serum of a normal man have no action whatever. Thus, as far as we shall be in presence of a case, suspected to be one of yellow fever, whose benignancy however, or the fact of having been seen rather late, did not allow a thorough diagnosis to be made, we can bring it into light in a rather easy way, searching the preventive properties of the serum. Take 2 c.c. of serum from the suspected person and inject it to a *Macacus rhesus*; 24 hours later, inoculate the same animal with a mortal dosis of virus, and if it does not contract the disease, this will mean that the serum is a preventive one, and there will be a high probability, if not a certainty, that the case was one of yellow fever; if, on the contrary, the animal gets ill, the case is to be considered as negative. This is a method to be experimented and which may lend useful services to the hygienist, explaining certain dubious cases, allowing the relation of some cases to others, and providing the hygienist with more precise epidemiologic data, a method of great advantage in certain cases.

This process was already used in three cases of a certain epidemiological importance in this city, being observed on two occasions, positive results together with the verification of the preventive properties of the serum from suspected persons, and in the third case, the proof was considered negative, showing plainly the suspicion of yellow fever was to be rejected, owing to the serum having protected the *rhesus* against the inoculation of the virus.

The results obtained in using this process of diagnose were of great usefulness for the epidemiologic works of the Public Health Department, for making clear the three cases above referred to.

VI

VACCINATION AGAINST YELLOW FEVER.

The vaccination against yellow fever, can be effected by two different methods, as well by way of passive immunisation through inoculation of serum from convalescents or from a monkey, immunized by repeated inoculations of virulent material, as by inoculating a vaccine prepared with blood or organs of infected monkeys.

We have used in many occasions, the serum from convalescents as a temporary protection method against the infection. It was at first used in Manguinhos to protect those working in the laboratories with infected monkeys and later on, its use was extended to people living amongst focii and to others who required a protection against any emergency. The number of such protected persons amounts to 50 or 60, all having well undergone the injections, which, only in one or another case, would cause a certain very short, quite individual depression. The serum used was that of persons who were with 15 days to one month recovering from mild and severe attacks of the illness. Between the persons thus protected against yellow fever, no case of the illness broke out up to this day, being used in same 1 to 2 c.c. serum, sub-cutaneously, as a vaccinating dosis.

The use of serum of convalescents is however a limited one, in view of the difficulties prevailing in getting it in big quantity allowing it to be used on a large scale.

We are immunising with blood and organs of infected *rhesus*, 1 horse and 2 sheep, 6 *rhesus* with a view to obtain in same, a serum having eventually a sufficient immunizing power, so as to be possibly advantageously used more extensively, in certain focii of the illness.

It is possible also that the serum of immunized animals whose preventive action has just been proved at the Pasteur Institute in Paris, may have also an efficient curing power in man, when used during the first days of the illness and in large quantities.

The vaccine against yellow fever, which is likely to obtain a big success, is obviously the one prepared with emulsion of organs of *Macacus rhesus* or *cynomolgus* and sterilized by either of the well known processes.

The French Commission of the Pasteur Institute had demonstrated that the warmed serum of a patient in the first days of the illness, when the virus is existing in him, had an obvious vaccinating power in relation to the yellow fever infection in man.

It was then to be expected that the organs of the *Macacus rhesus* or *cynomolgus* full with virus should offer more favourable conditions for preparing a vaccine, and, accordingly, since we infected the first *Macacus rhesus*, we used the organs of the animal to prepare it, reducing them to a pulp which, after being emulsified in sterilized water in the proportion of 1 to 9, was filtrated on gauze and sterilized by formol vapours, in accordance with the technic which has been in use amongst us since 1911 to sterilize the vaccine against fowl's spiroketosis.

The vaccine was already prepared and being tested in *rhesus*, and man, when we received HINDLE's work, giving an account of his interesting and precursory attempts with vaccines used by him against

yellow fever, one merely formolated, the other glycerinated and phenicated, using in both one part of liver against four of the sterilizing solute, in the first case formol at 1 o/oo and in the second a solute of 60o/o glycerine in phenicated water at 0.5o/o.

We decided then to prepare the glycerine and phenol vaccine, as recommended by HINDLE and to compare with another formolated 2 o/oo and phenicated at 0.5o/o with a view to obtain therewith a more perfect guaranty as to sterility as regards bacteria and fungi, without prejudice as to conservation of the virus. Both vaccines provided good results in the *rhesus*, protecting them against experimental infections and were, consequently, inoculated to man.

As the glycerinated vaccine would have shown more painful, we began to use in man, on a large scale the phenicated and formolated vaccine which is more easily borne, being hardly a little sensible at the moment of inoculating, and showing no posterior reaction.

The technic we nowadays apply to, for preparing the vaccine, is the following. We infect a sound *rhesus* or *cynomolgus*, with a doubtlessly mortal quantity of the virus, and when the animal, after having undergone the characteristical thermic rise, enters the stage of hypothermy, and sometimes even before this, it is then sacrificed by chloroform. The organs are immediately extracted with the maximum of asepsis, making use, for preparing the vaccine, of the liver, kidneys, spleen and brain, which are placed on large PETRI's dishes, sterilized and carefully examined. As soon as they prove to be perfectly sound, they are washed in a saline solution, wiped on sterile filter paper and weighed.

Afterwards the organs are cut into small fragments which are placed into a mortar with sterile washed sand, being then triturated carefully. This being done, to one part of organ, are added 5 of distillated water, sterilized, formolated at 2 per o/oo and phenicated at 0.5o/o shaking and stirring off the material until a fine and homogeneous emulsion is got at, which then is filtrated on 4 leaves of gauze and collected into a sterile matrass. This filtrate is the vaccine which then is kept in the ice-box for 5 days, after which delay, its complete sterility is verified, which is obtained by inoculations into anaerobian and aerobian mediums, and consequent inoculation of 0.5 c.c. to two Guinea pigs.

Since the culture mediums remain sterile, the vaccine is then distributed into ampules with the usual care and inoculated anew. If its sterility is perfect and the Guinea pigs, after the due time, remain sound, the vaccine may be considered as fit and ready for use in man.

The dosis in which it is used in an adult man is 2 c.c. sub-cutaneously, care being taken however to shake the ampule to emulsify the material it contains, which deposits when not in use.

The formolated and phenicated vaccine, prepared as aforesaid, is a roseous yellowish liquid. trouble, giving a light deposit and without disagreeable smell, neither that of the formol nor of the phenic acid it contains.

This vaccine began to be used in the Oswaldo Cruz Institute between the people who deal there with yellow fever, and having shown no disagreeable reactions, began to be of common use, and the Public Health Department already received it, and is being using it widely, in small

isolated focii of yellow fever in the State of Rio de Janeiro, the total of vaccinated persons being already computed in more than three hundred. It was always easily borne. It did not give troublesome reactions, and amongst the vaccinated people, there has been no case of yellow fever. However, as the question has been dealt with in a small scale only, and not richly observed, there is no possibility, for the time being, to make oneself a definite opinion at this respect.

Presently, about 2 thousand dosis are ready for experiments to be undertaken by the Public Health Department.

With our pursuance of Laboratory experiments with this vaccine, and its being used practically on a large scale, we may nourish the hope of reaching, in an early time, to positive and definite results as to its practical advantages, time of keeping, duration of the immunization, etc.

These are, here resumed, the results which up to this day, we have obtained from our researches, on yellow fever in Rio de Janeiro.

Notas sobre a Febre Amarella

Pelos Drs. A. MARQUES DA CUNHA e JULIO MUNIZ.

O apparecimento de alguns casos de febre amarella, no Rio de Janeiro, deu occasião a que fizessemos algumas pesquisas sobre o assumpto.

O fim da presente nota é relatar os primeiros resultados desses estudos.

Dividiremos este trabalho em duas partes, na primeira relataremos os ensaios tendentes a isolar a *Leptospira icteroides* de doentes de febre amarella, tentativas essas de resultados inteiramente negativos.

Na segunda parte, trataremos da transmissão da molestia a animaes de experiencia, no caso em questão representados pelo *Macacus rhesus*, cuja receptividade para a febre amarella foi demonstrada na Africa, por STOKES, BAUER e HUDSON. Empregamos tambem uma vez em nossas experiencias o *Macacus cynomolgus* que tambem se mostrou sensivel, conforme havia verificado o Dr. HENRIQUE ARAGÃO.

PESQUISA DA *LEPTOSPIRA ICTEROIDES*.

A pesquisa da *Leptospira icteroides* foi feita não só encarando esse microorganismo como possivel agente da doença mas tambem admittindo a hypothese formulada por SCHÜFFNER de considerar a *Leptospira* um germen de invasão secundaria. Por isso, as nossas pesquisas foram feitas não só no periodo em que o sangue é infectante, mas tambem em estadios adiantados da molestia em que a presença no meio circulante de microorganismos de invasão secundaria deveria ser mais provavel.

Empregámos em nossas tentativas sangue retirado em varias phases da molestia, desde o primeiro dia até o periodo agonico. O sangue era retirado e collocado em tubos contendo solução physiologica citratada a 2%. Muitas vezes a sementeira era feita logo após a retirada e outras após algumas horas de permanencia na geladeira á temperatura de 5º a 10ºC. Semeámos ora somente plasma, ora sangue total. De cada amostra de sangue semeavamos nunca menos de seis tubos de cultura e cada um delles com quantidades que variavam desde uma gotta até 2 a 3 c.c. Sempre empregámos o meio de NOGUCHI para *Leptospira*, tendo semeado algumas vezes alem do meio em questão, variantes desse meio taes como meio de NOGUCHI para *Leptospira* com camada de paraffina, o mesmo meio com um fragmento de orgão fresco de coelho. Tambem semeámos tubos com liquido de RINGER e ascite e tubos com sôro de coelho diluido em agua physiologica na proporção de $^1/_3$, $^1/_{15}$ e $^1/_{30}$.

As culturas eram conservadas á temperatura ambiente e observadas pelo espaço minimo de um mez. Todas as culturas que durante esse prazo apresentavam qualquer turvação, eram cuidadosamente examinadas em campo escuro. Nessas condições foram examinados sangues de 13 doentes, sendo alguns delles mais de uma vez em periodos differentes da evolução

da molestia. Os resultados com o fito de cultivar a *Leptospira icteroides* foram sempre negativos.

Com o sangue de alguns desses doentes foram inoculadas cobayas, por via intraperitoneal. Com o sangue, rim e figado dessas cobayas, foram feitas passagens para uma segunda serie de cobayas, as quaes serviram para fornecer material para uma terceira passagem. Com o sangue dos animaes dessas tres series, foram feitas sementeiras em meio de NOGUCHI para *Leptospira*. Os orgãos (figado, rim e capsula suprarenal) desses animaes foram examinados em campo escuro e após impregnação.

Tambem inoculámos cobayas com visceras (figado e rim) provenientes de autopsias de alguns casos de febre amarella, bem como com urina retirada do cadaver. Todos esses exames foram improficuos para evidenciar a presença de *Leptospira*.

TRANSMISSÃO DA FEBRE AMARELLA AO *MACACUS RHESUS*.

A primeira tentativa que fizemos para obter a infecção de *Macacus rhesus*, com sangue de amarellento, foi feita depois de decorrido algum tempo do apparecimento da molestia entre nós, pois no inicio de nossas pesquisas não dispunhamos desses animaes. Sómente mais de um mez após o apparecimento dos primeiros casos, foi que podemos realizar a primeira tentativa nesse sentido. Inoculámos então um *rhesus*, por via intraperitonial com sangue de um caso benigno, com cerca de 24 horas de molestia, o doente H. M., recolhido ao hospital annexo ao Instituto Oswaldo Cruz. O animal inoculado apresentou no 6º dia após a inoculação temperatura elevada de (40º) que baixou no dia seguinte. Passados alguns dias, observou-se nova elevação thermica depois da qual a temperatura se normalizou, nada mais apresentando o animal até agora.

Mais tarde inoculámos outro *rhesus* com o sangue do doente F. W., tambem recolhido ao hospital do Instituto Oswaldo Cruz. Esse doente apresentava tambem uma forma benigna da molestia. O sangue foi retirado cerca de 48 horas após o apparecimento dos primeiros symptomas e injectado no *rhesus* n. 6, por via intraperitonial. A temperatura do animal, tomada diariamente á tarde (graphico n. 1), manteve-se sem alteração oscillando entre 38,1 a 39,1 até o 10º dia em que se elevou a 39,7. A temperatura tomada no dia seguinte pela manhã (10 horas), era de 39,6. Duas horas depois a temperatura havia cahido a 38º. O animal foi então sacrificado e autopsiado. A urina retirada da necropsia apresentava-se de côr amarella e continha albumina e cylindros. O figado ao exame histologico apresentava lesões embora pouco extensas, semelhantes ás descriptas por STOKES, BAUER e HUDSON, taes como necrose, degeneração gordurosa e infiltração de polynucleares.

Com o figado desse macaco, conservado quatro dias na geladeira, foi inoculado um outro *rhesus* n. 8 cuja curva thermica se encontra no graphico n. 2. No 8º dia após a inoculação a temperatura, depois de ter apresentado pequenas elevações de 39,5 e 39,3, nos dias anteriores, era pela manhã de 37,6 (8,40 horas). As 13 horas a temperatura tinha cahido a 35,2 sendo então o animal sacrificado e autopsiado.

O exame histopathologico do figado não revelou aqui as lesões typicas conforme descreveram STOKES, BAUER e HUDSON, pois não

havia necrose das cellulas hepaticas ou se existia, era tão rara, que não poude ser encontrada pelo exame de alguns córtes. Havia além de degeneração gordurosa e infiltração de polynucleares, certas alterações da estructura nuclear, cujo estudo detalhado será feito pelo Dr. MAGARINOS TORRES.

O figado desse animal, conservado seis dias na geleira, injectado no *Rhesus* n. 14, deu logar a uma infecção com curva thermica habitualmente encontrada nesses animaes, como se vê no graphico n. 3. Esse animal apresentou no 6º dia quéda brusca de temperatura sendo então sacrificado. A autopsia revelou os signaes geralmente observados na febre amarella experimental, sendo que pelo exame histopathologico, se poude evidenciar a presença, embora pouco extensa, das lesões typicas de STOKES, BAUER e HUDSON acima referidas.

Posteriormente foram inoculados outros animaes, perfazendo até a presente data, 8 passagens successivas do virus. Nessas passagens temos empregado geralmente figado triturado com agua physiologica, filtrado em tella metallica e injectado por via sub-cutanea. Duas vezes empregámos sangue por via intraperitoneal, sendo que em uma dellas o sangue foi retirado na autopsia e inoculado em um *cynomolgus* que veio a morrer 14 dias após a inoculação. Outra vez, foi o sangue retirado em vida do animal, em periodo febril, dois dias antes de sacrificado (o sangue provinha do *rhesus* n. 14, cuja temperatura era na occasião de 40,5). O animal inoculado, *rhesus* n. 16, teve uma infecção com quéda brusca da temperatura no 6º dia. Em vista desses resultados, pensamos que para a passagem do virus se deve empregar de preferencia ou figado ou sangue, retirado em vida do animal, em periodo febril.

Queremos agora chamar a attenção para alguns factos que observámos no decurso de nossas pesquisas.

O primeiro facto se refere á febre. Em alguns dos animaes a temperatura maxima observada no decurso da infecção foi pouco elevada (39,7 no *rhesus* n. 6; 39,5 no *rhesus* n. 8; 39,3 no *rhesus* n. 16). Se adoptassemos o criterio da commissão constituida por STOKES, BAUER e HUDSON que sómente considera febre uma temperatura de 40º ou mais, esses animaes não teriam apresentado febre. Si porém compararmos essas temperaturas com as observadas anteriormente no mesmo animal, veremos que houve nitida elevação thermica. O que acabamos de affirmar resalta claramente do exame do graphico das temperaturas do *rhesus* n. 16, que embora apresentando uma temperatura maxima pouco elevada, 39,3, mostra sobre as temperaturas anteriores de 37,6 e 37,8 elevação bem nitida de 1,5. Assim pensamos que constitue melhor criterio para se saber se houve ou não febre no curso da infecção, a verificação de elevações da temperatura em relação ás tempeturas observadas anteriormente, no mesmo animal e não em relação a um limite determinado e invariavel para todos os animaes.

Outro facto da maior importancia se refere ás lesões observadas. Assim no *rhesus* n. 8, inoculado com figado do *rhesus* n. 6 que apresentava lesões typicas, embora pouco extensas, não havia no figado as lesões descriptas por STOKES, BAUER e HUDSON na Africa, pois não havia necrose das cellulas hepaticas. Desta forma, pelas lesões observadas no figado e de accordo com o que estabeleceu a esse respeito a commissão acima re-

ferida, não era possivel pelo exame histopathologico do figado fazer o diagnostico de febre amarella. O figado desse macaco inoculado no *rhesus* n. 14, deu logar a uma infecção com todas as caracteristicas da doença experimental, inclusive as lesões histopathologicas do figado, demonstrando assim, que o *rhesus* n. 8 estava effectivamente infectado com febre amarella.

Este facto se repetiu posteriormente em outro animal, o *rhesus* n. 19, de uma maneira ainda mais digna de nota.

Nesse caso, quasi todas as lesões geralmente encontradas e descriptas até então como caracteristicas da febre amarella experimental, faltavam completamente, existindo apenas infiltração gordurosa periporta. Nem mesmo as alterações da estructura nuclear observadas no *rhesus* n. 8, poderam ser encontradas aqui. Entretanto o figado desse animal, ao contrario do que era de esperar, reproduziu, quando inoculado no *rhesus* n. 22, uma infecção com todos os caracteres da febre amarella experimental, inclusive as lesões do figado, (necrose das cellulas hepaticas, degeneração gordurosa, infiltração de polynucleares, etc.). Convem assignalar que o *rhesus* n. 19 foi sacrificado no 5º dia após a inoculação depois de ter apresentado elevação de temperatura no 2º e no 4º dia. A temperatura era, no momento em que o animal foi sacrificado, de 38,8, isto é, mais ou menos normal, não tendo o animal apresentado o periodo de hypothermia observado em outros casos.

Assim, embora reconhecendo a importancia das lesões do figado na caracterisação da febre amarella experimental, podemos affirmar que a ausencia dellas não exclue a possibilidade da infecção do animal. Os dois casos acima citados, verificados em nossa serie de inoculações, fornece prova cabal desse facto.

Notes about Yellow Fever.

By Drs. A. MARQUES DA CUNHÀ and JULIO MUNIZ.

The occurrence of a few cases of yellow fever in Rio de Janeiro, gave us an opportunity to effect some researches about this disease. The object of the present note is to report upon the first results of these researches.

We shall divide our work into two parts. In the first we shall relate our attempts with a view to isolating the "*Leptospira icteroides*" from yellow fever patients, which attempts have led to absolutely negative results. In the second part, we shall deal with the transmission of the disease to experimental animals, represented, in the present case, by the *Macacus rhesus*, whose receptivity for Yellow Fever has been demonstrated in Africa by STOKES, BAUER and HUDSON. We made use also once, in our experiments, of the *Macacus cynomolgus* which alike proved sensible, according to Dr. B. ARAGÃO's verification.

RESEARCH OF THE "*LEPTOSPIRA ICTEROIDES*".

We undertook searching the *Leptospira icteroides* not only for considering this micro örganism as a possible factor of the disease, but also under the hypothesis, expressed by SCHUFFNER the *Leptospira* might represent a germ of secondary invasion. For this reason, our research were effected, not merely during the period in which blood is likely to infect, but also during advanced stages of the illness in which the presence in the blood of micro organisms of secondary invasion should appear as more likely to exist.

We used, for our attempts, blood extracted during various stages of the illness, since the first day up to the agonial period. The blood was extracted and placed into tubes containing a physiologic citrated 2% solution. Very often, the sowing was effected immediately after extracting the blood. Other ones were made after a few hours cooling on icebox at the temperature of 5 to 10°. We sowed, at times plasma only, at other times total blood. Of each sample of blood we never used to sow less than six tubes of culture, each of these with quantities varying from one drop to 2 and 3 ccm. The medium we always used was a medium of NOGUCHI for *Leptospira*, having sometimes sowed, besides the medium referred to, variants of this medium, such as NOGUCHI's for *Leptospira* with a coating of paraffin, the same medium with a fragment of fresh blood organ. We also sowed tubes with RINGER and ascite's liquide as also tubes with rabbit serum, diluated in saline solution in the proportion of $1/3$, $1/5$ and $1/30$.

The cultures were kept at the room temperature and observed for a period of not less than a month. All the cultures, which during this delay, would present any cloudiness, were carefully examined in dark field. Under these conditions, we examined bloods of 13 patients, some of which, more

than once, were at different stages of the illness. The results, as to trying to cultivate the *Leptospira icteroides*, remained always negative.

With the blood of some of these patients, we effected intra peritoneal inoculations in Guinea pigs. With the blood, kidney and liver of those Guinea pigs, we made passages to another series of Guinea pigs, which were used to provide material for a third passage. With the blood of the animals of these three lots, we made sowings in NOGUCHI's medium for *Leptospira*. The organs (liver, kidney and adrenals) were examined in dark field after impregnation.

We also inoculated Guinea pigs with viscera (liver and kidney) obtained from autopsies of a few cases of yellow fever as well as with urine extracted from the corpse. All these examinations were of no profit to make the presence of *Leptospira* obvious.

TRANSMISSION OF THE YELLOW FEVER TO THE *MACACUS RHESUS*.

The first attempt we made to obtain the infection of *Macacus rhesus* with blood of yellow fever patients was effected only after some times had elapsed since the illness appeared amongst us, for, at the beginning of our researches, we could not dispose of such animals. It was only more than one month after the first case broke out, that we were able to realize our first attempt in this way. We inoculated then, by via intraperitoneal, a *rhesus* with the blood of a benign case of about 24 hours duration The patient was H. M., admitted at the Hospital annexed to the Oswaldo Cruz Institute. This animal showed on the 6th day after the inoculation, a high temperature (40°) which dropped on the following day.

A few days later we observed a new thermic rise, after which the temperature grew normal again, and the animal did not show any more troubles, till now.

Later we inoculated another *rhesus* with the blood of the patient F. W. also admitted at the Hospital of the Oswaldo Cruz Institute. This patient showed also a mild form of the disease. The blood was extracted about 48 hours after appearing the first symptoms, and injected per via intraperitoneal to the *rhesus* monkey n. 6. The temperature of the animal, taken every day at evening (diagram n. 1) went on without change, oscillating between 38.1 and 39.1 until on the 10th day, it grew to 39,7. The temperature taken on the next morning (10 A. M.) was 39,6. The hours later, the temperature had fallen to 38°. The animal was then killed and autopsied. The urina extracted in the necropsy proved to be yellow containing albumin and cylinders. The histological examination of the liver, revealed lesions, notwithstanding of not a large extent similar to those described by STOKES, BAUER and HUDSON: necrosis, fatty degeneration, and polynuclear infiltration.

With the liver of that monkey preserved in icebox for 4 days, another *rhesus* n. 8 was inoculated whose thermic curve is shown in graphic n. 2. On the 8th day after the inoculation, the temperature, after having shown feeble rises of 39.5 and 39.3 in the course of the two days before, was in the morning 37.6 (8.40 A. M.). At 13 o'clocks the temperature had dropped to 35,2 being then the animal sacrificed and autopsied.

The histopathologic examination of the liver did not reveal the typical lesions as described by STOKES, BAUER and HUDSON, for there was no necrosis of the hepathic cells, or if any, it was so scarce as not to be seen in examining several sections. There was, beside the fatty degeneration and polynuclear infiltration, certain alterations in the nuclear structure, a detailed study of which will be made by Dr. MAGARINOS TORRES.

The liver of this animal kept in icebox for 6 days, and injected to *rhesus* n. 14, gave way to an infection with thermic curve, as usually found in these animals, which graphic n. 3 shows. This animal presented on the 6th day, a sudden drop of temperature, after which it was sacrificed. The autopsy revealed signs as generally observed in experimental yellow fever, viz. in the histopathologic examination the presence, though on a very small scale of the typical STOKES, BAUER and HUDSON lesions, necrosis, fatty degeneration and polymorphonuclear infiltration could be made patent.

Later on, other animals were inoculated totalizing to this date, 8 successive passages of virus. In these passages, we generally used liver stuff, finely triturated with saline solution, filtrated on wire cloth and injected subcutaneously. We used twice blood per via intraperitoneal, once being blood extracted after autopsy and inoculated to a *cynomolgus* which happened to die 14 days after the inoculation. The second time, we used blood extracted alive, from the animal in the febrile stage two days before being sacrificed. The blood proceded from the *rhesus* n. 14, whose temperature, was by the time, 40.5°. The inoculated animal, *rhesus* n. 16, had an infection with sudden drop of temperature on the 6th day. In view of such results, we are of opinion that, for passing the virus, either liver or blood extracted alive from the animal in the febrile stage has to be preferred.

We should like to call now attention to snme facts observed by us in the course of our researches.

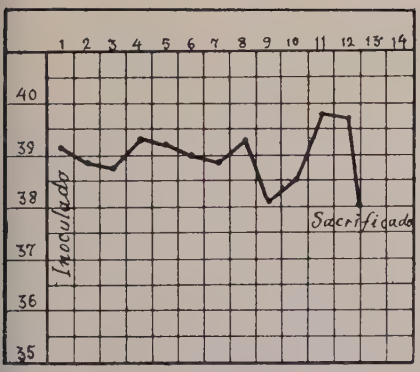
The first refers to fever. In some of the animals, the maximum temperature observed in the course of the disease, was not a high one (39.7 in *rhesus* n. 6, 39.5 in *rhesus* n. 8 and 39.3 in *rhesus* n. 16). Should we adopt the criterium of STOKES, BAUER and HUDSON who only consider a fever, a temperature of 40° and upwards, then these animals would not have shown fever whatever. If however, we compare these temperatures with those observed formerly in the same animal, we shall see there has been an obvious thermic rise. What we just affirmed goes out clearly examining the temperature graphics of *rhesus* n. 16, which in spite of not showing a little elevated maximum temperature, 39.3, points out, on the former temperatures of 37.6 and 37.8 a plain increase of 1.5°. Accordingly, we think verifying temperature rises in comparizon with former temperature observated in the same animal, but not in relation with a determined unvarying limit for all the animals, constitutes a better criterium to know whether or not there was a fever in the course of the infection.

Another fact of higher importance refers to the observed lesions. Thus, in *rhesus* n. 8, inoculated with liver from *rhesus* n. 6, which showed typical lesions, even if to a small extent. there were in the liver, none of

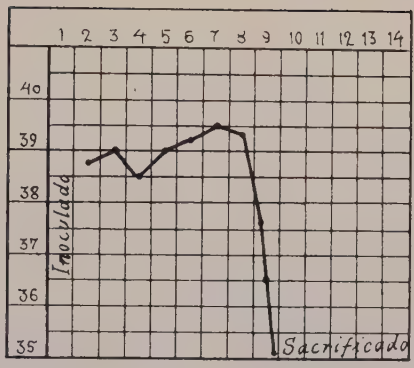
the lesions as discribed by STOKES, BAUER an HUDSON in Africa, while there was no necrosis of the hepathic cells. In this way, from the lesions observed in the liver, and according to what was established on this subject by the Commission above referred to, it was not possible, after histopathologic examination of the liver, to make a diagnosis of yellow fever. The liver of this infected monkey, inoculated to *rhesus* n. 14 gave way to an infection with all the characteristics of the experimental disease, including the histopathologic lesions of the liver, thus demonstrating that *rhesus* n. 8 was in a fact infected by yellow fever.

This fact occurred anew later on, in another animal, *rhesus* n. 19, in a still more noteworthy manner. In that case, almost all the lesions generally found and described up to now, as characteristics of experimental yellow fever would miss completely, hardly existing periportal fatty infiltration. Nor even could be found there the alteration of the nuclear structure observed in *rhesus* n. 8, meantime, the liver of that animal against any expectation, reproduced, when inoculated to *rhesus* n. 22, an infection with all the characters of experimental yellow fever, including the liver lesions, necrosis of hepathic cells, fatty degeneration, polynuclear infiltration, etc. We must point out that the *rhesus* n. 14 was sacrificed on the 5th day posterior to the inoculation, after having shown temperature rise on the 2nd and 4th days. The temperature was, by the time the animal was killed, 38.8 i, e, more or less normal, the animal having hundergone no hypothermic period, as observed in other cases.

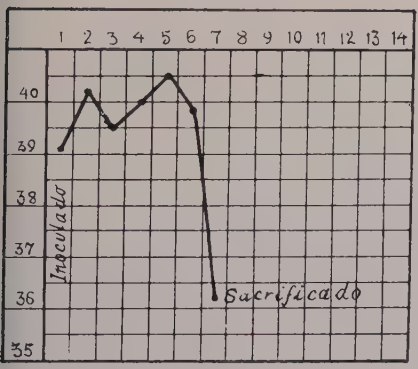
Thus, though we acknowledge the importance of the liver lesions in characterizing experimental yellow fever, we may affirm that the missing of same does not elude the possibility of infection of the animal. The two above stated cases, controlled in our series of inoculations furnished a formal proof thereof.



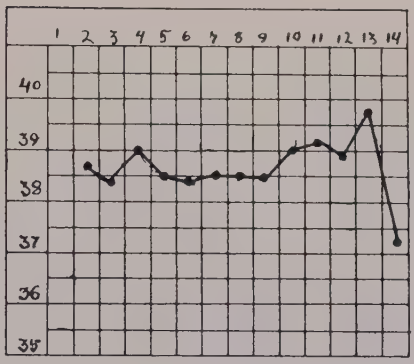
N. 1—*Rhesus 6*



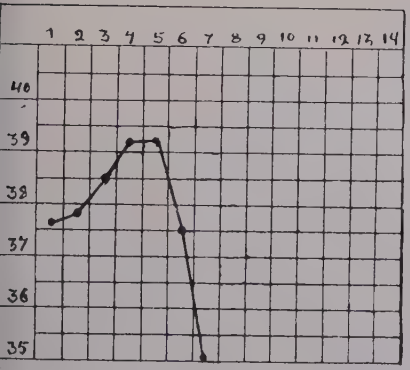
N 2—*Rhesus 8*



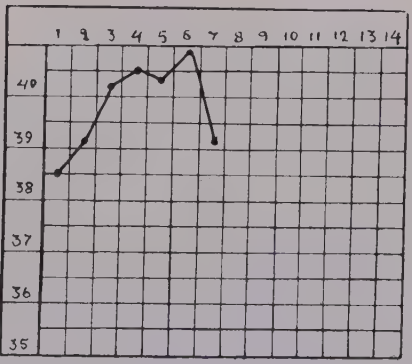
N. 3—*Rhesus 14*



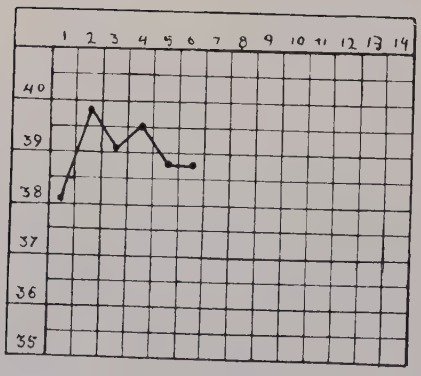
N. 4—*Cynomolgus 15*



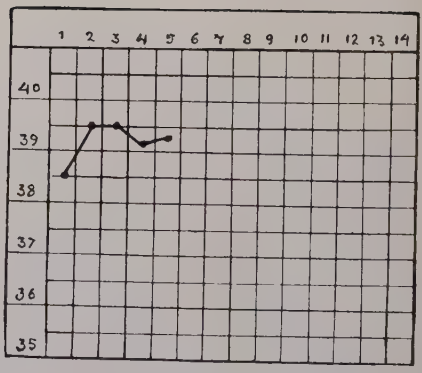
N. 5—*Rhesus 16*



N. 6—*Rhesus 17*



N. 7—*Rhesus 19*



N. 8—*Rhesus 22*

Alterações nucleares das cellulas do figado nas infecções de MACACUS RHESUS e M. CYNOMOLGUS pelo virus da febre amarella.

Pelo Dr. C MAGARINOS TORRES.

Examinando, a pedido dos Drs. BEAUREPAIRE ARAGÃO, A. MARQUES DA CUNHA e J. MUNIZ, material histologico proveniente de diversos *Macacus rhesus* e *M. cynomolgus*, a maioria inoculados com o virus da febre amarella, outros não inoculados e mortos de tuberculose e causas não esclarecidas, fomos levados a confirmar as verificações daquelles pesquizadores no que diz respeito aos seguintes pontos: 1º.—A inoculação de sangue de casos benignos de febre amarella nos primeiros dias de molestia, ou de *Aedes ægypti* infectados reproduz em *M. rhesus* as lesões obtidas por STOKES, BAUER e HUDSON, pela inoculação do virus africano (ARAGÃO); 2º.—Outras vezes, as lesões produzidas no figado, embora da mesma natureza das mencionadas pela Commissão Americana, offerecem menor intensidade, acontecendo que, pela passagem em serie, em *M. rhesus*, ellas podem apresentar uma notavel variabilidade, especialmente no que respeita á degeneração gordurosa e necrose das cellulas hepaticas; em duas occasiões foi mesmo possivel observar inteira auzencia das lesões mencionadas pela Commissão Americana em figados capazes, no entanto, de reproduzir, na passagem seguinte, aquellas alterações (CUNHA e MUNIZ).

Particularmente difficil tornou-se assim, por vezes, a interpretação do exame histo-pathologico justamente na questão que mais interessava ao investigador que era a de decidir se o animal apresentava ou não as lesões da febre amarella experimental.

Em *M. rhesus* que, inoculados com o virus da febre amarella, morreram com symptomas e lesões semelhantes aos descriptos por STOKES, BAUER e HUDSON, verificámos ao lado das "lesões typicas" daquelles auctores, alterações nucleares da cellula hepatica, da mesma natureza das descriptas em certas doenças causadas por virus filtraveis (herpes, varicella, virus III do coelho) ora sob o nome de "inclusões acidophilas intranucleares", ora sob o de "degeneração oxychromatica".

Tendo já analysado detalhadamente, em outro lugar, o referido processo, nos limitamos aqui a reproduzir uma estampa colorida na qual procurámos dispor as diversas phases do processo, de accordo com a sua provavel seriação. Accentuaremos apenas aqui que, as figuras *g* e *h*, (Est. colorida) pela sua abundancia relativa e configuração caracteristica, facilitam o reconhecimento do processo, não tendo, afóra isso importancia especial; estudos posteriores, tambem, nos mostraram que, em alguns casos, o nucleolo apparece perfeitamente distincto da substancia acidophila intranuclear que se accumula na porção central do nucleo a qual assim, se origina independentemente de substancias nucleolares.

Completamos a documentação com duas microphotographias, feitas com identica ampliação, uma de figado de *M. rhesus* não inoculado e cujos

nucleos mostram estructura conservada; outra de um figado de *M. rhesus* inoculado com o virus da febre amarella e na qual qnasi todas as cellulas mostram a alteração mencionada.

Bem caracterisada a "degeneração oxychromatica" das cellulas do figado nos animaes inoculados com virus, e conhecida as relações desse processo com determinadas doenças causadas por virus filtraveis, algumas questões logo surgiam cuja solução offerecia bastante interesse.

Seria a degeneração oxychromatica da cellula hepatica uma alteração cellular banal e commum, comparavel assim á degeneração gordurosa, á necrobiose daquelle elemento, processos estes ultimos, que são assaz frequentes não só em *M. rhesus* inoculados com virus amarillico, como nos mortos de tuberculose e de causas obscuras e tambem em outros macacos inoculados com diversos organismos (*Cebus macrocephalus* inoculados com *Leptospira icteroides* – MULLER, NOGUCHI), ou seria ella uma alteração peculiar á infecção pelo virus da febre amarella?

A resposta aqui depende, naturalmente, de um modo estreito, do numero do *M. rhesus* não inoculados e submettidos ao exame histo-pathologico. Quanto maior elle fôr, tanto mais segura a conclusão.

Até o presente momento não conseguimos encontrar a degeneração oxychromatica senão em *M. rhesus* inoculados com o virus, embora os não inoculados que examinámos apresentassem alterações cellulares de natureza variada, taes como degeneração gordurosa, necrose e necrobiose. Assim sendo, devemos responder que, baseados em verificações feitas até o momento, a degeneração oxychromatica da cellula hepatica constitue uma alteração cellular encontrada unicamente em macacos inoculados com o virus da febre amarella e sob esse ponto de vista pode ser tida como uma lesão caracteristica do figado na febre amarella experimental, não tendo relação com outras alterações cellulares communs.

Outra questão era estabelecer qual o valor da degeneração oxychromatica como lesão capaz de autorizar um diagnostico positivo de infecção na febre amarella experimental no decurso de experimentações com o virus.

Que um tal diagnostico offerece reaes difficuldades se quizermos baseal-o, unicamente, em dados histo-pathologicos, ficou atraz claramente indicado; a razão está na grande variabilidade das lesões de animal para animal, no papel importante que podem ter factores subjectivos na analyse histo-pathologica e ainda no facto de lesões hepaticas até agora ahi assignaladas, taes a degeneração gordurosa, necrose e necrobiose, não serem lesões de modo algum especificas da infecção pelo virus amarillico.

É claro que se a degeneração oxychromatica constituisse um processo, embora especifico, mas evidenciavel com difficuldade ou de modo inconstante, ficaria logo prejudicada a ideia de aproveital-a sob esse ponto de vista.

Mas tal não succede, e a fig. 2 documenta de modo cabal, a intensidade que algumas vezes ella possue nas infecções pelo virus brasileiro.

Na nossa opinião, a degeneração oxychromatica constitue um dos melhores criterios para decidir se o *M. rhesus* apresenta ou não lesões attribuiveis ao virus da febre amarella, desde que sejam feitas certas reservas que decorrem das considerações que passamos a analysar.

Não pudemos, ainda, realizar o estudo systhematisado das lesões nucleares, sacrificando o animal inoculado em phases da evolução da doença experimental que julgassemos mais opportunas; aproveitámos, apenas, o material de BEAUREPAIRE ARAGÃO, A. MARQUES DA CUNHA e J. MUNIZ, obtido no decurso de pesquizas que tinham um objectivo diverso. Comtudo já alguma coisa podemos adiantar pelo estudo desse material.

Assim, a degeneração oxychromatica existia em quatro *M. rhesus* sacrificados no quinto dia de inoculação com figado contendo virus, faltando em um outro, sacrificado com o mesmo prazo de infecção; era presente em quatro animaes sacrificados no sexto dia, em um *M. cynomolgus* sacrificado no setimo dia, em um *M. rhesus* no oitavo dia, em um no nono dia, em dois no decimo dia, em um no decimo primeiro dia, em um *M. cynomolgus* no decimo quarto dia e em um *M. rhesus* sacrificado no decimo quinto dia. Não mais a encontrámos em um *M. rhesus* que, sobrevivendo, foi sacrificado no decimo nono dia.

Quanto á intensidade ou á facilidade com que era encontrada, temos a informar que se apresentava extraordinariamente abundante em dois *M. rhesus* sacrificados no 6º dia, um inoculado com sangue, outro com figado de macaco contendo virus, ainda em um sacrificado no 8º e em dois outros sacrificados no 10º dia, um dos quaes fôra inoculado com *Aedes ægypti* infectados (v. a fig. 2).

Em quatro *M. rhesus* sacrificados no quinto dia, em um *M. cynomolgus* sacrificado no setimo dia, em um *M. rhesus* sacrificado no nono dia e em um outro sacrificado no decimo primeiro, a degeneração oxychromatica era bastante abundante, sendo facilmente encontrada nos córtes histologicos.

Em dois *M. rhesus* sacrificados no sexto dia, e em um *M. cynomolgus* sacrificado no decimo quarto dia, ella era discreta.

Finalmente, em um *M. rhesus* morto no decimo quinto dia, ella era encontrada com difficuldade.

Em relação á sua constancia nos animaes inoculados, as nossas observações não foram ainda realisadas de modo satisfactorio, visto como dependem, necessariamente, da collaboração effectiva dos pesquizadores que trabalham com o virus e assim, só mais tarde, poderão ser levadas a effeito.

Examinando porém, juntamente com CUNHA e MUNIZ, uma serie de inoculações em *M. rhesus*, confirmamos as suas verificações a respeito da variabilidade das lesões hepaticas e da auzencia das descriptas como typicas por STOKES, BAUER e HUDSON, em macacos (2ª. e 5ª. passagens) cujo figado, no entanto, continha o virus conforme mostraram os symptomas e as lesões em animaes inoculados posteriormente.

Em um dos animaes (2ª. passagem), a degeneração oxychromatica foi a unica lesão da cellula hepatica verificada, sendo ahi, bastante intensa: em um outro (5ª. passagem), ella mesma não poude ser reconhecida mostrando o figado apenas discreta infiltração gordurosa periporta.

RESUMO E CONCLUSÕES.

No figado de um *Macacus rhesus* inoculado por BEAUREPAIRE

ARAGÃO com sangue de um caso benigno de febre amarella e no qual elle descreveu symptomas e lesões typicas semelhantes ás obtidas por STOKES, BAUER e HUDSON pela inoculação com o virus africano no mesmo animal, encontrámos alterações nucleares da mesma natureza das assignaladas no herpes zoster, herpes symptomatico, varicella e virus III do coelho e descriptas ora sob o nome de "inclusões acidophilas intranucleares" (LIPSCHÜTZ, GOODPASTURE), ora sob o de "degeneração oxychromatica" (LAUDA e LUGER).

Alterações nucleares semelhantes da cellula hepatica encontrámos, posteriormente em 13 *M. rhesus* e 2 *M. cynomolgus* inoculados com o virus brasileiro da febre amarella o qual fôra isolado independentemente por BEAUREPAIRE ARAGÃO e depois por A. MARQUES DA CUNHA e J. MUNIZ de dois casos benignos de febre amarella, tendo sido um dos macacos injectado directamente com o sangue do doente; dois macacos foram inoculados com *Aedes ægypti* infectados em homem e em macaco; os demais foram animaes empregados em passagens em serie do virus pelo macaco, e talvez esse facto explique até certo ponto, as notaveis differenças por vezes encontradas nas alterações histopathologicas do figado, visto como, em condições naturaes, o virus nunca passa directamente de homem para homem.

A intensidade com que se apresenta a degeneração oxychromatica de modo algum está na dependencia das alterações do conteúdo gorduroso, necrose e necrobiose encontradas; em um caso, ella era a unica alteração presente no figado, sendo então particularmente intensa.

As inclusões acidophilas intranucleares (degeneração oxychromatica) não foram encontradas em diversos *M. rhesus* não inoculados e mortos por causas obscuras; no entanto, em taes figados eram presentes infiltração e degeneração gordurosas associadas a alterações de necrose e necrobiose.

Alguns estadios (figuras intranucleares "em borboleta" e "em ameba", v. fig. *g* e *h*, Est. colorida) sendo abundantes, facilitam, em virtude de sua configuração especial, o reconhecimento da degeneração oxychromatica em córtes feitos segundo uma technica rapida (pequenos fragmentos de figado fixados em formol aquecido a 60ºC.—trinta minutos, córtes em congelação, hematoxylina, eosina, alcool absoluto, phenol-xylol-creosoto, xylol, balsamo), não tendo, afóra isso, importancia especial.

Ao passo que a degeneração e infiltração gordurosa, bem como a necrose e a necrobiose da cellula hepatica apresentam variações consideraveis em sua intensidade de um para outro animal em uma passagem em serie não interrompida do virus pelo *M. rhesus*, chegando mesmo a faltar inteiramente em dois animaes cujo figado, no entanto, mostrou-se capaz de reproduzir symptomas e lesões typicas na passagem seguinte, as inclusões acidophilas intranucleares (degeneração oxychromatica), de regra, se encontram com muito maior regularidade. Em dois *M. rhesus* mortos no 6º dia, em um no 8º e em dois no 10º dia, a degeneração oxychromatica era de tal modo abundante que quasi todas as cellulas do figado se mostravam attingidas (v. fig. 2); em um delles, conforme atraz ficou dito, sendo bastante intensa, era a unica alteração encontrada no figado.

Em *M. rhesus* mortos no 14º e no 15º dias de inoculação, a dege-

neração oxychromatica era escassa, mostrando-se inteiramente auzente em um outro morto no 19º dia.

Apparentemente occorre, assim, uma desapparição gradual das inclusões acidophilas intranucleares das cellulas hepaticas depois de ahi terem sido muito abundantes, em alguns casos, no 10º dia (v. fig. 2). No entanto, a degeneração gordurosa e a necrose podem persistir, sendo, de facto ainda intensas em um macaco morto no 15º dia, e no qual a degeneração oxychromatica, mostrava-se, comtudo, assaz escassa.

Em um macaco morto no 5º dia, o qual transmittio o virus a um outro animal, não foi encontrada degeneração oxychromatica no figado, sendo uma ligeira infiltração gordurosa periporta a unica lesão ahi existente; a degeneração oxychromatica, no entanto, reappareceu no animal inoculado em seguida.

Levando em conta que, algumas vezes, na passagem em serie não interrompida do virus da febre amarella pelo *M. rhesus*, o figado pode apresentar uma apparencia normal, que as alterações histopathologicas são muito variaveis em intensidade de um animal para outro e que a intensidade com que se apresenta a degenaração oxychromatica varia conforme o dia de inoculação em que morre o animal, as inclusões acidophilas intranucleares são, na nossa opinião, mais capazes de assegurar o diagnostico histopathologico da doença provocada no *M. rhesus* de que qualquer outra alteração anteriormente ahi assignalada.

As verificações effectuadas não contradizem a hypothese de que as inclusões acidophilas intranucleares estejam associadas á presença do virus no interior das cellulas affectadas, de accordo com o que muitos auctores affirmam em relação a outras doenças produzidas por virus filtraveis onde existem alterações nucleares semelhantes (herpes zoster, herpes symptomatico, varicella, virus III do coelho).

Admittindo-a, facil se torna explicar a apparente independencia entre degeneração oxychromatica e degeneração gordurosa, necrose e necrobiose no figado: as primeiras são devidas á presença e talvez, multiplicação do virus no interior das proprias cellulas, as segundas se achando antes na dependencia de uma toxemia concomitante.

SUMMARY AND CONCLUSIONS.

In the liver of one *Macacus rhesus* injected by BEAUREPAIRE ARAGÃO with blood of one benign case of yellow fever and in which he described (1) symptoms and typical lesions similar to those obtained by STOKES, BAUER and HUDSON in *M. rhesus* injected with the African virus, it has been found (2) changes in the nuclei analogous to those refered to in herpes zoster, symptomatic herpes, varicella and virus III infection of rabbits, and described either under the name of "acidophilic intranuclear inclusions" (LIPSCHÜTZ, GOODPASTURE), either as "oxychromatic degeneration" (LAUDA and LUGER).

---

(1) ARAGÃO, H. B.—Brasil Medico, 1928, Anno XLII n. 27.
ARAGÃO, H. B.—Communicação á "Societé Brésilienne de Biologie" em 24 de Junho de 1928.

(2) TORRES, C. M.—Communicações á "Societé Brésilienne de Biologie" em 24 de Junho e 29 de Julho de 1928.

Similar changes in the nuclei of liver cells were afterwards found by me in 13 *M. rhesus* and 2 *M. cynomolgus* injected with the Brazilian virus of yellow fever recovered independently by BEAUREPAIRE ARAGÃO (3) and A. MARQUES DA CUNHA and J. MUNIZ (4) from two benign cases of yellow fever; one of these monkeys was directly injected with the blood from the patient; two were injected with *Aedes ægypti* after having fed upon the blood of yellow fever patients or experimentally infected *M. rhesus*; the others were monkeys used in an unbroken series of passages of the virus through *M. rhesus*, and perhaps this accounts for notable differences found in the histopathology of the liver from case to case, as under natural conditions the virus never passes directly from man to man.

The degree in which the oxychromatic degeneration occurs is in no way dependent upon the degree in which fatty and necrobiotic changes are found; in one instance it was the only change present in the liver, being there particularly intense.

The acidophilic intranuclear inclusions (oxychromatic degeneration) were not present in several *M. rhesus* not inoculated and dying of tuberculosis or obscure causes; notwithstanding in these livers, fatty infiltration and degeneration associated to necrobiotic changes were found.

Some stages ("butterfly" and "entamoeba-like" intranuclear figures, s. coloured Plate figs. *g*, and *h*) are rather frequent and by its characteristic shape facilitate the recognition of oxychromatic degeneration in sections made by a rapid technique (small pieces of liver fixed in folmaldehyde heated to 60°C—thirty minutes, frozen sections, hematoxylin, eosin, absolute alcohol, phenol-xylol-creosote, xylol, balsam) having no peculiar importance besides this.

Since the fatty degeneration and infiltration, necrosis and necrobiosis of the cells present considerable variations in degree from case to case in an unbroken series of passages of the virus through *M. rhesus*, lacking in two animals the liver of which was able to reproduce typical symptoms and lesions in the following passage, the acidophilic intranuclear inclusions (oxychromatic degeneration), as a rule, were found with much more regularity. In two *M. rhesus* killed on the 6th day, in one on the 8th, and in two on the 10th day, oxychromatic degeneration was so abundant as to occurs in almost every liver cell (s. fig. 2); in one instance, as previously reported, being rather intense, it was the only change found in the liver.

In two *M. rhesus* killed on the 14 and 15th days of inoculation, the oxychromatic degeneration was scarce and it was entirely absent in another killed on the 19th day.

Apparently it occurs, therefore, a gradual disappearance of the acidophilic intranuclear inclusions from the liver cells after having been in some cases very pronounced on the 10th day (s. fig. 2). Notwithstanding the fatty and necrobiotic changes can persist and were, in fact, rather in-

---

TORRES, C. M.—Brasil-Medico, 1928, Anno XLII, n. 36.

TORRES, C. M.—Sciencia Medica, Anno VI, n. 9, 1928.

(3) ARARÃO, H. B.—loc. cit.

(4) CUNHA, A. M. e MUNIZ, J.—Communicação á "Societé Brésilienne de Biologie", em 29 de Julho de 1928.

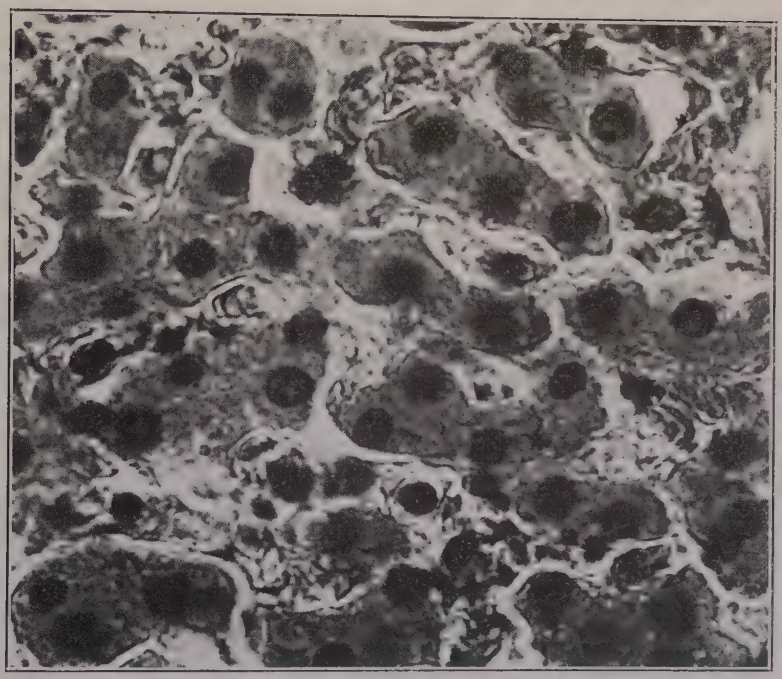


Fig. 1—Corte de figado de *M. rhesus* não inoculado. As cellulas hepaticas mostram nucleos normaes. Phot. J. Pinto

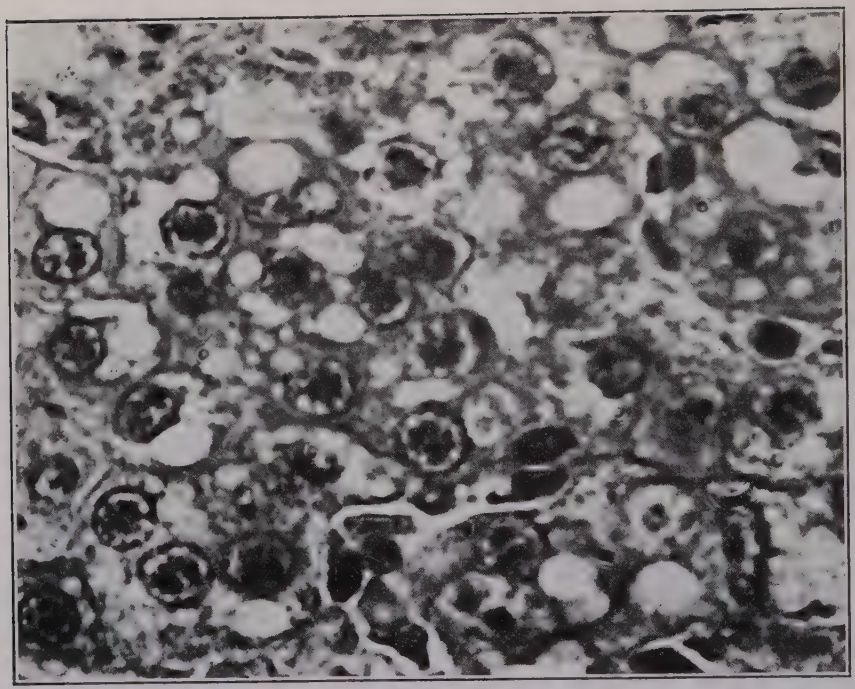
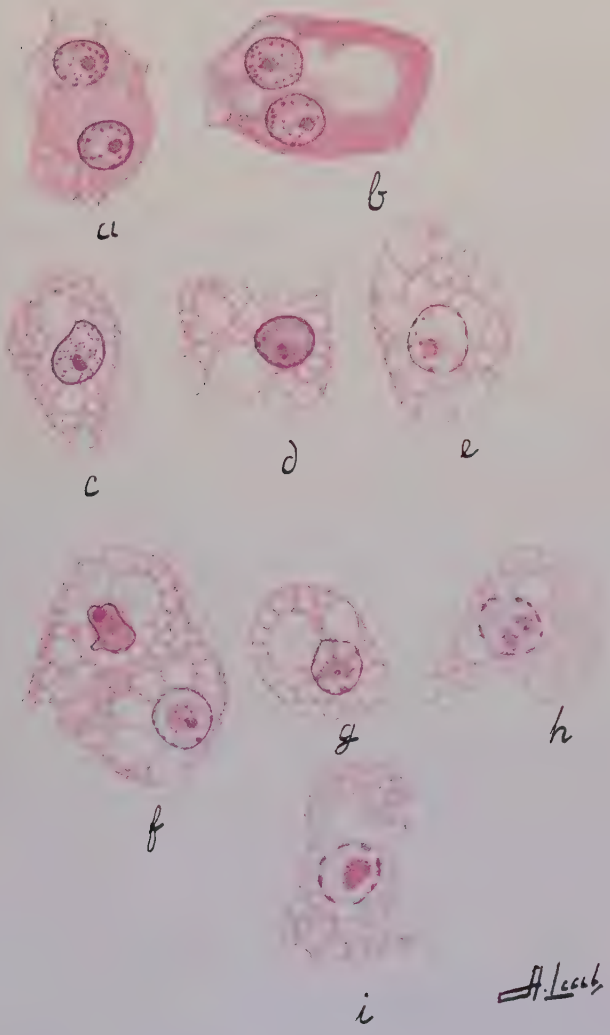


Fig. 2—Corte de figado de *M. rhesus* inoculado com *Aedes ægypti* infectados em doente de febre amarella e morto no decimo dia de inoculação. Quasi todas as cellulas apresentam inclusões acidophilas intranucleares. Phot . J. Pinto

C. MAGARINOS TORRES: Inclusões acidophilas intranucleares (degeneração oxychromatica) na febre amarella experimental.



Cellulas hepaticas *Macacus rhesus* em córtes fixados no HELLY e corados pela hematoxylina-eosina.

Em *a* e *b*, cellulas normaes. Em *c*, *d* e *e*, phases precoces da degeneração oxychromatica. Em *f*, *g*, *h* e *i*, phases adiantadas do mesmo processo. Em *g*, figura intranuclear em "ameba". Em *h*, figura intranuclear em "borboleta".

tense in a monkey killed after 15 days, in which the oxychromatic degeneration was however very scarce.

In one monkey killed after 5 days and which carried the virus to another animal, no oxychromatic degeneration was found, slight fatty periportal infiltration being the only change observed in the liver; the oxychromatic degeneration reappeared however in the next passage.

If one takes into account that sometimes in an unbroken series of passages of the virus of yellow fever through *M. rhesus* the liver shows a normal picture, that the histopathologic changes are very variable in intensity from case to case and that the degree in which the oxychromatic degeneration is found changes according to the day of inoculation the animal is killed, the acidophilic intranuclear inclusions, in my opinion, are more liable to assure the histopathologic diagnosis of the disease induced in *M. rhesus* than any other pathological findings previously mentioned there.

The facts brought to light do not contradict the presumption that the acidophilic intranuclear inclusions are associated to the presence of the virus inside the affected cells, as stated by many writers in respect to other filterable virus diseases in which similar changes occur in the nuclei (herpes zoster, symptomatic herpes, varicella, virus III infection of rabbits).

Assuming this it is explained at once the apparent independence between oxychromatic degeneration and fatty and necrobiotic changes in the liver, the former being related to the presence and possibly, multiplication of the virus itself inside the cells, the late being in the dependence of an associated toxemia.

To Drs. BEAUREPAIRE ARAGÃO, A. MARQUES DA CUNHA and J. MUNIZ I am indebted for their courtesy in lending me tissues for histopathologic study from the monkeys used in the course of their experiments.

Fig. 1—Magnification × 1,150. Section of the liver from a *M. rhesus* non-inoculated. The liver cells are seen to have a normal nucleus.

Fig. 2—Magnification × 1,150. Section of the liver of a *M. rhesus* injected with *Aedes ægypti* after having fed upon the blood of yellow fever patient and killed on the 10th day of inoculation. Almost every liver cell is seen to present acidophilic intranuclear inclusions.

PLATE

Liver cells from several *M. rhesus* inoculated with the Brazilian virus of yellow fever. Many stages of the oxychromatic degeneration are represented. In *h* and *g*, "butterfly" and "entamoeba-like" intranuclear figures. Figure *e* is similar to fig. 14 of RIVER's, article on filterable viruses. Amer. Jour. Path., 1928, Vol. IX, n. 2, pg. 91.

O liquido cephalo-racheano na febre amarella

Pelos Drs JOSÉ GUILHERME LACORTE e GILBERTO GUIMARÃES VILLELA.

Tivemos occasião de examinar uma dezena de liquidos cephalo-racheanos de doentes de febre amarella. A escassez dos casos foi devida á difficuldade existente na retirada de material de doentes que estão na maioria em estado grave e em outros nos quaes o clinico julga inopportuna a puncção lombar. Além disso, o material retirado em alguns casos não foi sufficiente para todas as reacções. Sahem estas notas rapidas como inicio de estudo mais apurado para outra occasião, se houvér.

Abaixo seguem os dados referentes aos exames praticados.

Tensão: Em todos os casos o "liquor" sahiu com forte tensão, chegando mesmo, em uma vez, a escoar com forte jacto.

Aspecto: A' excepção de um caso em que houve hemorrhagia leve das meninges, e em outro em que se apresentou amarellado (xanthochromia) o aspecto foi sempre limpido e crystallino.

Cytologia: O exame cytologico nada accusou de anormal. No liquido hemorrhagico as hematias ficaram bem coradas, assim como os globulos brancos. Nos demais, os lymphocytos tiveram sempre aspecto e porcentagem normaes, o mesmo se dando com a quantidade por millimetro cubico (de 0,26 a 0,55).

Reacções de globulinas: Das reacções commummente exigidas pelos clinicos em exames de "liquor" praticámos as de PANDY e NONNE-APPELT. A de PANDY foi sempre negativa, ao contrario da de NONNE-APPELT que foi positiva em todos os casos, ora forte ora fracamente. Não sabemos como explicar esta discordancia dado o rigôr com que praticámos as reacções, sempre empregando testemunhos.

Reacção de WASSERMANN: Negativa em todos os casos mesmo num liquido de doente com WASSERMAMN positivo no sôro.

Indice de refracção: Manifestou-se um pouco elevado em todos os liquidos (de 1,3356 e 1,3360) (apparelho de ZEISS ABBE, temperatura fixa de 17,5º).

Exame chimico:

Pigmentos biliares: Resultado negativo em todos os casos, mesmo no unico liquido amarello que examinámos (xanthochromia).

Urobilina: Resultado negativo em todos os casos.

Glycose: Apresentou-se com taxa elevada sómente num caso grave da doença (0,80 º/ºº).

Albumina: Elevada em todos os casos (de 0,25º/ºº a 0,55º/ºº methodo de RAVAUT).

Chloretos: Normaes num dos casos (0,72º/º), elevados nos restantes (de 0,77º/º a 0,85º/º).

Calcio: Normal (de 4,2 a 5,2 milligrammas por º/º).

Inoculação experimental em animaes: Um ponto ainda não decidido é a infectuosidade do liquido cephalo-racheano. Resolvemos verifical-o e

para esta prova trabalhamos junctamente com o Dr. HENRIQUE ARAGÃO. Foram inoculados tres *Macacus rhesus* com 10 cc. cada um de liquido retirado de dois doentes com menos de 72 horas de doença e outro com mais tempo. Estes animaes não apresentaram os signaes classicos da molestia experimental. Inoculamos igualmente coelhos e cobayas que permaneceram sem alteração.

Infelizmente o numero restricto dos casos não permitte conclusão definitiva a respeito.

Le liquide cephalo-rachidien dans la fièvre jaune

Par les Drs. JOSÉ GUILHERME LACORTE et GILBERTO GUIMARÃES VILLELA.

Nous avons pu examiner une dizaine d'échantillons de liquide céphalo-rachidiens provenant de malades de fièvre jaune. La rareté des cas mis à notre disposition est due à la difficulté qui se présente pour prélever de ce matériel à des malades qui, pour la majeure partie, sont gravement atteints, ou à d'autres, chez lesquels le praticien juge inopportune la ponction lombaire. De plus, le matériel prélevé dans quelques cas, n'a pas été suffisant pour toutes les réactions.

Nous donnons ci-dessous les détaits relatifs aux examens pratiqués.

Tension : Dans tous les cas, le liquide est sortie avec forte tension, arrivant même, une fois, à former un jet.

Aspect: A l'exception d'un cas où il y eut hémorrhagie légère des méninges, et d'un autre où il se présenta jauni, (xanthochromie) l'aspect fut toujours limpide et cristallin.

Cytologie: L'examen cytologique ne montra rien d'anormal. Dans le liquide hémorrhagique, les hématies restèrent bien colorées, de même que les globules blancs. Dans les autres, les lymphocytes ont toujours gardé leur aspect normal et pourcentages normaux, la même chose se produisant pour la quantité par millimètre cube (de 0.26 à 0.55).

Réaction de globulines: Parmi les réactions communément exigées par les praticiens dans les examens de liquide nous avons pratiqué celles de PANDY et de NONNE-APPELT. Celle de PANDY a toujours été négative, au contraire de la deuxième qui fut positive dans tous les cas, tantôt fortement, tantôt faiblement. Nous ne savons comment expliquer cette discordance étant donnée la rigueur avec laquelle nous avons effectué ces réactions, en employant toujours des témoins.

Réaction de WASSERMANN: Négative dans tous les cas, même avec un liquide de malade où le WASSERMANN était positif avec le sérum. Indice de réfraction: Un peu élevé dans tous les liquides (de 1,3356 à 1,3360, appareil de ZEISS-ABBE, temperature fixe de 17,5º).

Pigments biliaires: Résultat négatif dans tous les cas, même dans l'unique liquide jaune que nous avons examiné (xanthochromie).

Urobiline: Résultat négatif dans tous les cas.

Glucose: Ne s'est présentée avec un taux élevé que dans un cas grave de la maladie (0,80 º/ºº).

Albumine: Elevée dans tous les cas (de 0,25 à 0,55‰, méthode de RAVAUT). Chlorures: Normaux dans l'un des cas (0,72‰); élevés dans les autres (de 0,77‰ à 0,85‰).

Calcium: Normal (de 4,3 à 5,2 milligrammes pour ‰).

Inoculations expérimentales chez des animaux: un point pas encore élucidé, c'est l'infectiosité du liquide céphalo-rachidien. Nous avons résolu de le vérifier et pour cette épreuve, nous avons travaillé avec le Dr. HENRIQUE ARAGÃO. Nous avons inoculé trois *Macacus rhesus* avec 10 cc. chacun, de liquide prélevé sur deux malades atteints depuis moins de 72 heures, et sur un malade plus ancien. Ces animaux n'ont pas présenté les signes classiques de la maladie expérimentale. Nous avons inoculé également des lapins et des cobayes qui sont demeurés indemnes.

Malheureusement, le nombre restreint des cas ne permet pas de tirer de conclusion définitive à ce sujet.

Observações sobre alguns elementos da urina na febre amarella.

Pelo Dr. J. C. N. PENIDO.

Na actual epidemia da Febre Amarella, tivemos opportunidade de fazer exames em serie, nas urinas dos doentes internados no Hospital Oswaldo Cruz. Desejavamos vêr quaes as modificações de alguns elementos no decorrer da doença e se pelos elementos da urina poderiamos chegar a qualquer indicação quanto ao diagnostico ou prognostico.

Examinámos urinas de mais de 20 doentes, em condições excellentes, a maioria das vezes. As technicas seguidas foram as indicadas pelo Dr. J. CARNEIRO FELIPPE e todas ellas rigorosamente applicadas.

Posteriormente, lançando mão de outros processos, em material do Hospital S. Sebastião, pudémos verificar a exactidão dos nossos resultados, comparando-os com os obtidos pelo Dr. FELIPPE.

Os caracteres geraes são modificados do modo seguinte:

Volume — Diminuido no principio da doença e augmentado na convalescença. Por outras razões, não nos foi possivel estudar este ponto, para verificar a eliminação de liquidos. No emtanto, embora não tenhamos dados muito completos e perfeitos, temos a impressão que o volume fica reduzido em todos os casos nos primeiros dias da doença. Esta reducção de volume é mais ou menos proporcional á gravidade do caso. Nos casos benignos ha uma reducção de 20 a 30%, reducção esta que se accentua nos de extrema gravidade, nos quaes o volume é praticamente nullo. A reducção do volume total por 24 horas é phenomeno commum a todas as doenças febris e a Febre Amarella não faz excepção.

Côr — É de amarello topazio durante o periodo febril, igual á dos febricitantes; na convalescença a côr póde chegar ao verde garrafa, pela presença de pigmentos biliares, em quantidade formidavel. Em certos casos depois do periodo febril, a côr é amarello-palha.

Cheiro — E o proprio das urinas normaes.

Reacção — É acida ao papel de tournesol.

Densidade — E em geral mais elevada que a normal, não seguindo a sua variação qualquer modificação systematica. Explica-se perfeitamente esta ausencia de variação systematica, pelas concentrações variaves e oppostas de alguns elementos que se acham dissolvidos no liquido.

Dos constituintes normaes, dosámos systematicamente a uréa, os chloretos em Na Cl, e o acido urico e bases puricas reductoras do iodo (reactivo de RUHEMANN).

A concentração da uréa varia conforme a gravidade do caso. Nos casos benignos e nos primeiros dias da doença, a sua concentração é cerca de 2 1/2 vezes o valor normal (Graphicos n. 1 e 2).

Nos casos de gravidade média, e tambem nos primeiros dias da doença, a concentração é cerca de 1 1/2 vez maior que o normal (Graphico

n. 3). Nos casos mortaes, no decurso da doença, a concentração não attinge os valores normaes (Graphicos n. 4 e 5).

Em uma urina de cadaver, verificámos a concentração de 4gr,02 em 1000. Não se tratava de um caso da forma anurica, pois havia 80 c.c. de urina na bexiga, ao passo que nessas formas se encontram apenas algumas gottas de urina ou no maximo alguns centimetros cubicos.

Excluidas as formas muito graves, encontra-se tambem augmentada a eliminação diaria da uréa, pois a reducção de volume é menor que o augmento da concentração. Infelizmente não tivemos um só caso em que pudessemos verificar estes elementos desde as primeiras horas da doença.

A convalescença se dá bruscamente e nessa occasião a concentração e a eliminação total da uréa diminuem tambem bruscamente, ficando ás vezes abaixo do normal, para attingil-o quando se acha curado o doente.

Vê-se pois que se póde chegar a algumas conclusões prognosticas pela apreciação dos valores da eliminação uréica. Naturalmente nos casos em que os numeros que exprimem essas concentrações estão nas zonas intermediarias, a conclusão é mais difficil.

Os chloretos, expressos em Na Cl, seguem uma marcha inversa á da uréa. Sua concentração é a quinta parte ou mais que o valor normal no inicio da doença. Este é um phenomeno geral observado em qualquer caso da doença, quer os benignos, quer os mortaes. Sómente uma vez, num doente cuja agonia foi particularmente longa, observámos uma concentração elevada de chloretos, na urina excretada nesse periodo (Graphico n. 4). Em outro, o caso mais benigno dos examinados, houve diminuição da concentração dos chloretos, em cerca de metade, no 3º e 4º dias. Foram as excepções que encontrámos. A regra porem é a concentração oscillar entre 0,5 e 2,5 p. 1000 nos primeiros dias da doença e augmentar bruscamente no momento da crise da convalescença.

Na vespera dessa crise de chloruria a concentração baixa, ás vezes, mais que nos primeiros dias (Graphico n. 1). Não se póde allegar que seja a pequena eliminação de chloretos condicionada pela falta de absorpção de Cl. Desde que o estado do doente o permittia, era-lhe fornecido alimento salgado que levava ao organismo uma quantidade de Na Cl muito superior á eliminada nas 24 horas immediatas.

O Dr. J. TEIXEIRA teve occasião de, num caso benigno, no 6º dia de molestia, fazer a prova de eliminação de chloretos (technica LIPCHWITZ) e verificou que o rim era perfeitamente permeavel nesse caso. Tratava-se de um caso particularmente benigno, no fim do periodo febril, que provavelmente entrára em convalescença.

Crêmos que no decurso da doença ha uma notavel diminuição na eliminação de chloretos, mais accentuada do que informam os auctores, e portanto retenção desses elementos no organismo. Confirmam o nosso ponto de vista as dosagens feitas no sangue e no liquor, nos quaes, na maioria dos casos, os chloretos estão augmentados (Drs. J. CARNEIRO FELIPPE, J. G. LACORTE e G. G. VILLELA).

O acido urico e bases puricas, reductoras do iodo, são, em regra, augmentados nos primeiros dias, nos casos benignos. Nos demais casos este augmento é pequeno e suas variações se dão na proximidade de 0,8 p. 1000. Raramente encontramos taxas abaixo da normal no decurso da do-

ença. Na convalescença no emtanto ha uma sensivel baixa dessas bases. A concentração desses elementos é mais ou menos parallela á concentração da uréa.

Dos elementos anormaes, pesquizámos a albumina verdadeira, a pseudoalbumina e a glycose. As duas primeiras foram encontradas em todos os casos.

A albumina verdadeira, sempre presente, tem uma concentração muito variavel. Nos casos benignos a quantidade é relativamente pequena (cerca de 0,50 p. 1000) e rapidamente desapparece. Nos casos mortaes e graves esta quantidade é muito grande (2 a 12 grammas) e persiste durante mais tempo.

A pseudo-albumina tambem foi encontrada em quantidade menor que a albumina, desapparecendo mais precocemente.

A glycose nunca foi encontrada no primeiro periodo. Sómente uma vez na convalescença de uma forma grave encontrámos glycose, em pequena quantidade, durante um curto periodo. É interessante assignalar este facto porque os doentes, além dos alimentos, recebiam systematicamente injecções de sôro glycosado, por via rectal ou subcutanea. Vê-se que o organismo, no correr da molestia, retem normalmente o assucar.

Os pigmentos biliares só foram encontrados no periodo de convalescença. Por vezes a quantidade era tão accentuada que a urina se tornava de côr verde-garrafa. Nos primeiros dias, porém, a sua ausencia na urina foi a regra, sem excepções.

Os saes biliares, no emtanto, apparecem mais precocemente que os pigmentos, porém nunca no periodo primario da doença.

A urobilina foi encontrada em todos os casos e em quantidades muito variaveis. Não a dosámos por processo chimico, limitando-nos a apreciar a quantidade pelo gráo de fluorescencia. Nada podemos concluir quanto á urobilinuria quer para o diagnostico ou prognostico. Como este chromogenio se encontra em numerosas doenças, crêmos que o seu valor é muito pequeno para o diagnostico da infecção.

A indoxila foi encontrada em grandes quantidades nas formas graves e principalmente naquellas em que havia abundantes hemorrhagias intestinaes. Nas formas benignas e nas graves, não hemorrhagicas, a ausencia desse chromogenio é a regra. O seu apparecimento na quantidade normal dá-se na convalescença.

O sedimento da urina dos amarellentos é muito interessante. Na phase de invasão observa-se uma descamação epithelial muito forte de todo o apparelho urinario. Vê-se um numero excessivo de cellulas epitheliaes, chatas, em raqueta, fusiformes, cylindricas pequenas e cylindricas grandes, e sempre numerosos leucocytos. A' medida que a infecção evolue, começam a desapparecer as cellulas epitheliaes chatas e em raqueta, persistindo e dominando em numero as epitheliaes cylindricas, ao lado de leucocytos. Na convalescença desapparecem essas cellulas cylindricas grandes e reapparecem as epitheliaes chatas normaes da urina. A cylindruria é muito frequente e encontrámos como moda cylindruria granulosa no periodo febril, a granulosa e hyalina no periodo de convalescença e finalmente a hyalina e cerea nas proximidades da cura. Tambem notámos nos casos benignos uma cylindruria epithelial, de mixtura com cylindros de outros typos. Essa cylin-

druria mixta é nas formas graves excessivamente intensa. Cónvem notar que esses cylindros desapparecem com facilidade nas urinas fermentadas. Ao lado desses elementos cellulares, notámos crystaes de uratos e abundante substancia amorpha, principalmente nas urinas conservadas em baixa temperatura. Tambem devemos assignalar uma crise de oxalaturia que observámos nos casos benignos no fim da convalescença. Talvez haja alguma relação entre essa oxalaturia e os cylindros de calcio observados em córtes de rim de amarellentos.

CONCLUSÕES.

I. Pode-se avaliar a gravidade dos casos de febre amarella pelo exame em serie da urina.

II. Nos casos benignos, a uréa existe em grande concentração na urina e a sua eliminação diaria é elevada.

III. Nos casos mortaes, a eliminação da uréa é muito reduzida e sua concentração muito abaixo da normal.

IV. A eliminação de chloretos é muito diminuida quer nos casos graves quer nos benignos.

V. O acido urico e bases puricas eliminam-se de modo semelhante á uréa.

VI. A eliminação dos chloretos e da uréa seguem uma marcha inversa um ao outro. Ha augmento da eliminação dos chloretos e diminuição da eliminação da uréa no momento da convalescença.

VII. A albuminuria e a cylindruria são a regra desde o 3o dia.

VIII. Não ha glycosuria durante o decurso da doença.

IX. No sedimento urinario encontram-se cellulas cylindricas grandes, provavelmente provenientes dos tubos rectos do rim.

X. Na febre amarella a eliminação de urina se dá como nas nephroses.

Observations on a few elements of urine in yellow fever.

By Dr. J. C. N. PENIDO.

During the actual epidemic of yellow fever, we had an opportunity to make serial examinations, of the urines of patients under treatment at the Oswaldo Cruz Hospital. We were anxious to see what modifications of the elements of the urine occurred during the course of the illness, and also whether by examination of the elements of urine, a diagnosis or prognosis of the disease could be arrived at.

We examined urines of more than 20 patients, in most cases under excellent conditions. The technical methods followed were those indicated by Dr. J. CARNEIRO FELIPPE, all of which were rigourously performed.

Later on, applying other processes, using material obtained from S. Sebastian Hospital, we checked the accuracy of our results, by comparing them with those obtained by Dr. FELIPPE.

The general characteristics of urines were found modified in the following way:

Volume—Reduced at the beginning of the illness and increased during convalescence. For different reasons, it was not possible to study this point, in order to control the elimination of liquids. Although we missed complete and thorough data, we have a feeling that the volume is reduced in every case during the first days of the illness. This reduction of the volume is more or less proportional to the severeness of the case.

In mild cases, there is a reduction of from 20 to 30 o/o, which reduction is more accentuated in extremely severe cases, being practically nil in the latter. The reduction of the total volume per 24 hours is a phenomenon common to all febrile diseases there being no exception in the case of yellow fever.

Color—Topaz yellow during the febrile stage, as in other type of fever; during convalescence the color may acquire a bottle-green shade, owing to the presence of biliar pigments, in large quantity. In certain cases, after the febrile stage, the tint is straw-yellow.

Odor—The odor is the same as in normal urines.

Reaction—Acid to litmus paper.

Specific gravity—Generally higher than normal, however not following in its variation, any systematical alteration. This absence of a systematical variation finds a perfect explanation in the varying and opposed concentrations of some elements existing as solutes in the liquid.

Of normal components, we systematically measured the urea, the chlorides in Na Cl and the uric acid and puric bases which reduce the iodine (RUHEMANN's reagent).

The concentration of urea varies according to the severeness of the

case. In mild cases, as also in the first days of the illness, its concentration is about 2 1/2 times the normal value (Graphics 1 and 2).

In cases of medium seriousness, and also during the first days of the illness, the concentration is about 1 1/2 times higher than the normal (Graphic 3). In mortal cases during the course of the illness the concentration never reaches the normal values. (Graphics 4 and 5).

In a urine from a corpse, we verified a concentration of 4gr,02 per 1000. It was not a case of the anuric form, for there were 80 c.c. of urine in the bladder, whereas in the anuric form only a few drops, or hardly a few cubic centimeters should be found.

Excepting in very severe forms, the daily elimination of urea is also increasing, while fhe reduction of volume of the urine is less than the increase of urea concentration. Unluckily, we did not have a single case at hand in which we were able to control these elements from the first hours of the Illness.

The convalescence appears suddenly, and at this time the concentration and the total amount of eliminated urea decreases equally in a very sudden manner, remaining sometimes under the normal amount untill the patient is cured.

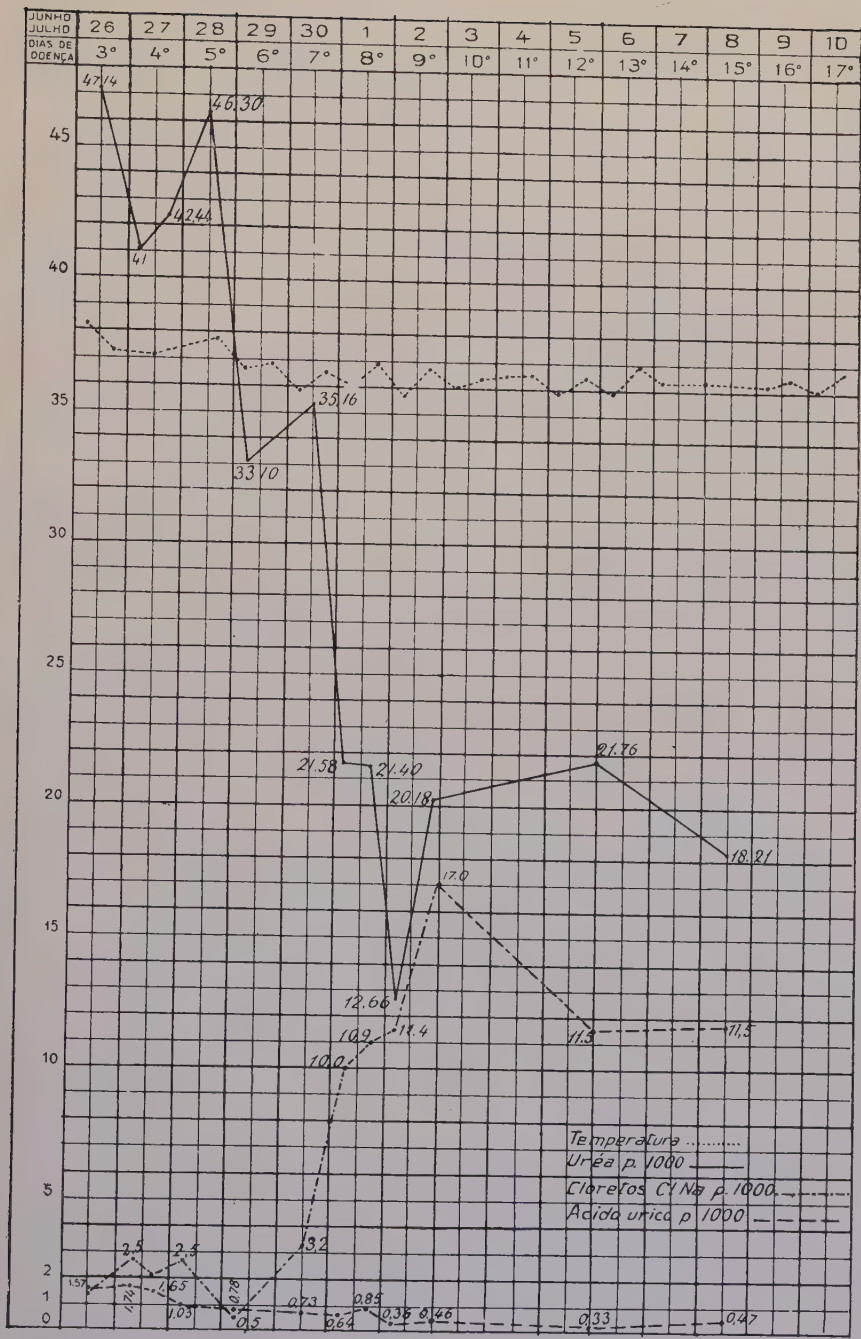
We realize then that some prognostical conclusions can be arrived at, through an appreciation of the values of ureics elimination. Of course, in cases in which the numbers stating those concentrations remain in the intermediary zones, the conclusion is a more difficult one.

The chlorides specified in N a Cl follow a process inverse of the urea diagram. Their concentration is the fifth part, or more, of the normal value at the beginning of the illness. This is a general phenomenon observed in whatever case of the disease, either mild or mortal. Only once, in a patient whose agony lasted a particularly long time, we observed a very high concentration of chlorides in the urine, excreted during this period. (Graphic 4) An another occasion, in the mildest of the examined cases, there was a decrease of the chloride concentration, about one half on the 3rd and 4th day. These were the exceptions we met with. As a rule, however, the conconcentration oscillates between 0.5 and 2.5 per 1000 in the first days of illness, and increases suddenly at the moment of the convalescence crisis.

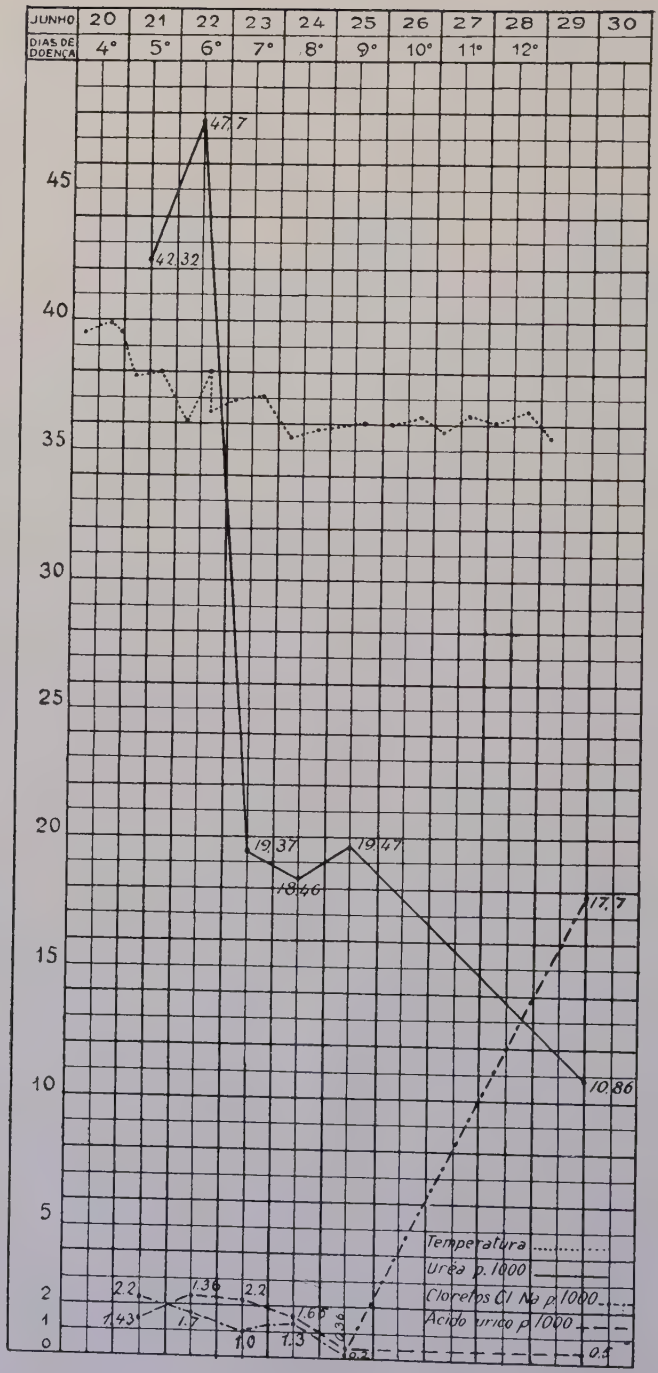
On the day before this crisis of chloruria the concentration, sometimes falls lower than in the first days (Graphics 1 and 2). One can not say the small chlorid elimination should be determined by the lack of chlorine absorption. When condition permitted the patient was provided with salted food which brought to the system a quantity of Cl Na higher than the amount eliminated during the next 24 hours.

Dr. J. TEIXEIRA had an opportunity, in a mild case, on the 6th day of the illness, to make a proof of the chloride elimination (LIPCHWITZ technics) and ascertained that the kidney was perfectly permeable in this case. The case was a particularly mild one at the end of the febrile stage probably already entering into the convalescence stage.

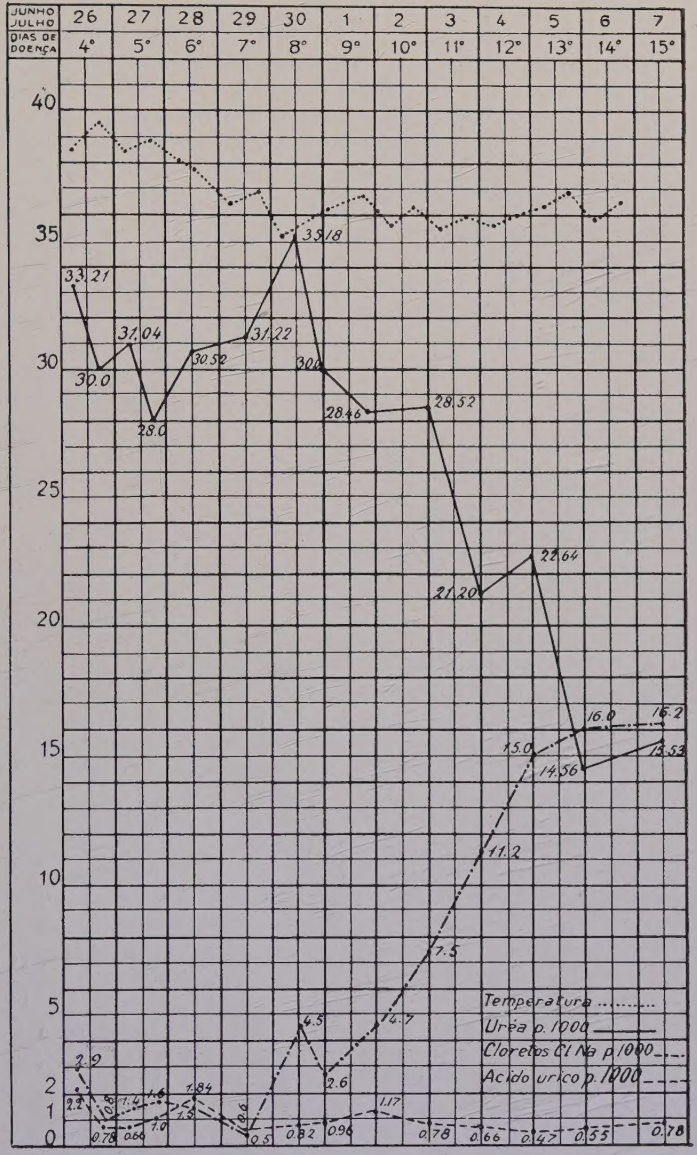
We believe that, in the course of the illness, there is a noteworthy decrease in the chlorides eliminated, more accentuated than stated by reference books, and consequently a retention of those elements within the system. This is confirmed by the measurements effected in the blood and


JUNHO JULHO
DIAS DE DOENÇA
26 27 28 29 30 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
3° 4° 5° 6° 7° 8° 9° 10° 11° 12° 13° 14° 15° 16° 17°
47.14
46.30
42.44
41
35.16
33.70
21.58
21.40
20.18
21.76
18.21
17.0
12.66
11.4
10.92
10.0
11.3
11.5
3.2
2.5
2.5
1.57
1.65
1.03
0.78
0.5
0.73
0.85
0.64
0.36
0.46
0.33
0.47
45
40
35
30
25
20
15
10
5
2
1
0
Temperatura .....
Urêa p. 1000 ———
Cloretos ClNa p. 1000 - - - - -
Acido urico p. 1000 — — — —

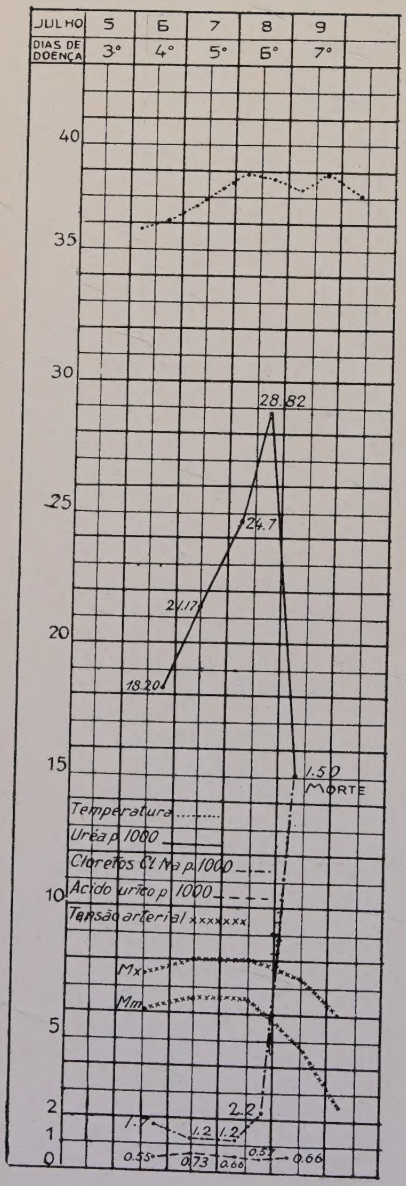
Graphico n. 1


JUNHO
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
DIAS DE DOENÇA
4°
5°
6°
7°
8°
9°
10°
11°
12°
45
40
35
30
25
20
15
10
5
2
1
0
47.7
42.32
19.37
18.46
19.47
17.7
10.86
Temperatura
Urea p. 1000
Cloretos Cl Na p. 1000
Acido urico p. 1000
2.2
1.43
1.36
1.7
2.2
1.0
1.66
1.3
1.36
0.5
0.5

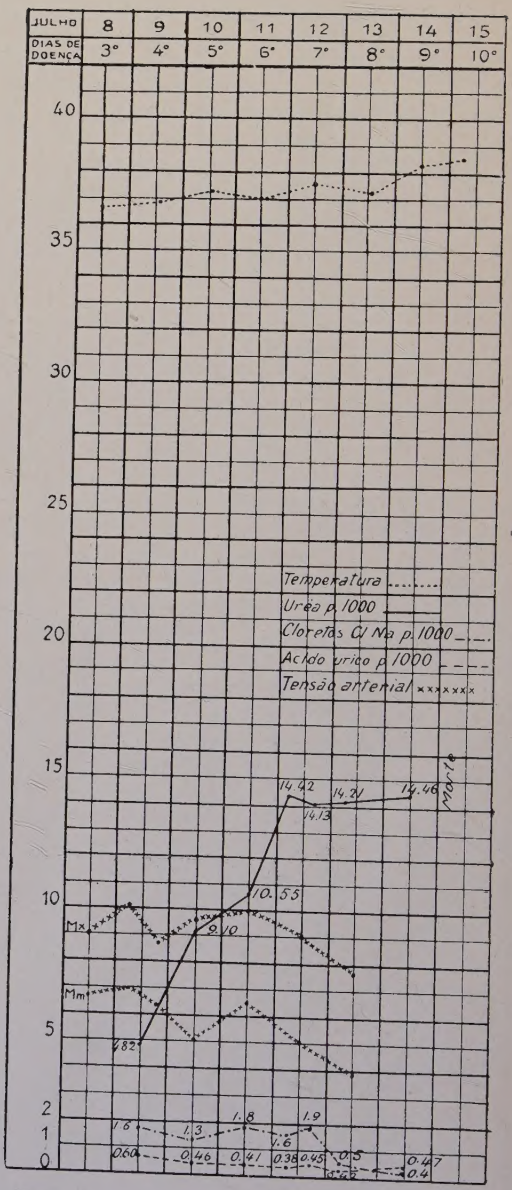
Graphico n. 2


JUNHO
JULHO
DIAS DE DOENÇA
26 27 28 29 30 1 2 3 4 5 6 7
4° 5° 6° 7° 8° 9° 10° 11° 12° 13° 14° 15°
40
35
30
25
20
15
10
5
2
1
0
33.21
30.0
31.04
28.0
30.52
31.22
35.18
30.0
28.46
28.52
21.20
22.64
16.0
16.2
15.0
14.56
13.52
11.2
7.5
4.5
4.7
2.6
2.9
1.84
1.17
0.78
0.66
0.5
0.82
0.98
0.78
0.66
0.47
0.55
0.78
Temperatura .....
Urêa p. 1000 ———
Cloretos Cl Na p. 1000 ----
Acido urico p. 1000 - - -

Graphico n 3



Graphico n. 4



Graphico n. 5

liquor in which, in most cases, chlorides are increased (Drs. J. CARNEIRO FELIPPE, J. G. LACORTE and G. G. VILLELA).

The uric acid and the puric bases, reducing agents of iodine are, as a rule, increased in the first days in mild cases. In other cases, this increase is of small extent and its variations are given in the vicinity of 0.8 per 1000. We seldom found the quantities of the above to be less than normal during the course of the illness. However during convalescence, there is a sensible fall of these rates. The concentration of these elements is more or less parallel to the urea concentration.

Of the abnormal elements, we searched for the real albumin, the pseudo-albumin and glucose, the two first were found in all cases.

The real albumin, always present, has a highly varying concentration. In mild cases, the quantity is rather small (about 0.50 per 1000) and disappears quickly. In fatal and severe cases, this quantity is very high (2 to 12 grams) and persists for a longer time.

The pseudo-albumin was also found in less quantity than albumin disappearing still earlier.

Glucose was never found in the first period. Only once, in the convalescence of a severe form we found glucose, to a small extent during a short period.

It is interesting to report this fact, because the patients, besides being fed, systematically received injections of glucosed serum, either via rectal or subcutaneous. One sees that the system, in the course of the illness, normally retains sugar.

The biliar pigments were only observed in the period of convalescence. At times the quantity was so high that the urine would turn to a bottle-green shade. In the first days however, its absence from the urine was complete, without any exception.

The biliar salts, however, appear earlier than the pigments, but however never during the primary period of the illness.

The urobilin was found in every case and in most variable quantities. We did not measure this by a chemical process. We confined ourselves to estimating the quantity by the degree of fluorescence. We were unable to conclude that urobilin neither could be used either for diagnosis or for prognosis purposes. As this chromogen is to be found in numerous diseases, we believe its value is of very small value for the diagnosis of the illness.

The indoxyl was found in big quantities in the severe forms, principally those in which there were abundant intestinal hemorrhages. In mild or in severe which were not hemorrhagic the absence of this chromogen is a general rule. Its reappearance in normal quantity occurs during the convalescence.

The sediment in the urine of yellow fever patients is very interesting in the invading stage, a very strong epithelial desquamation of the whole urinary apparatus is to be observed. One sees an excessive number of epithelial cells, flat, racket shaped, fusiform, cylindrical small and large and always numerous leucocytes. As the disease progresses the flat and racket-shaped epithelial cells begin to disappear. The cylindrical epithelials and the leucocytes remain and dominate in number the flat and racket

shaped epithelial cells. In the convalescence stage the large cylindrical epithelial cells disappear and then the normal flat ones of the urine appear again. Cylindruria is most frequent, and we find as a rule the granulous cylindruria during the febrile stage, the granulous and hyaline in the period of convalescence and finally the hyaline and waxy about the time of the cure of the illness. We also noted in mild cases an epithelial cylindruria in combination with cylinders of other kinds. This combined cylindruria is in severe forms exceedingly intense. It is to be noted that these casts easily disappear in fermented urines. Besides the cellular elements, we observed crystals of urates with an abundant amorphous substance especially in urines kept in low temperatures. We must also point out a crisis of oxalaturia which we observed in the mild cases at the end of the convalescence. There might be perhaps some relation between this oxalaturia and the lime casts observed in cuts of kidney of yellow fever patients.

CONCLUSIONS.

I. We may determine the severeness of yellow fever cases by serial examination of urines.

II. In mild cases, urea exists in high concentration in the urine and its daily elimination is high.

III. In fatal cases, the elimination of urea is much reduced and its concentration much below the normal.

IV. The elimination of chlorides is very small, either in severe or in mild cases.

V. Uric acid and puric bases are eliminated in a similar way as urea.

VI. The elimination of chlorides and urea follow an inverse process in relation, one to the other. There is an increase of the elimination of chlorides and a decrease of the elimination of urea at the time of convalescence.

VII. Albuminuria and cylindruria appear as a rule at the 3rd day.

VIII. There is no glycosuria during the course of the illness.

IX. In the urinary sediment, large cylindrical cells are to be found, probably proceeding from the tubes of the kidney.

X. In yellow fever the elimination of urine effects itself as in nephrosis.

Typ. do Instituto Oswaldo Cruz — Rio de Janeiro — Brasil.